



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Identificación de marcadores moleculares en levaduras
extremófilas, aisladas de lagunas Altoandinas de la
Sierra Central del Perú contaminadas con relaves
mineros**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo
Parasitólogo

AUTOR

Diego MACEDO PRADA

ASESOR

Mg. Tito Libio SÁNCHEZ ROJAS

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Macedo, D. (2018). *Identificación de marcadores moleculares en levaduras extremófilas, aisladas de lagunas Altoandinas de la Sierra Central del Perú contaminadas con relaves mineros*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



Universidad Nacional Mayor De San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO PARASITÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

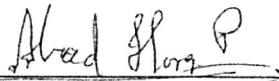
Siendo las 15:30 horas del 09 de enero de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo** de **DIEGO MACEDO PRADA**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 015-EPMP-2018, el titulando expuso su tesis: **"IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN LEVADURAS EXTREMÓFILAS, AISLADAS DE LAGUNAS ALTOANDINAS DE LA SIERRA CENTRAL DEL PERÚ CONTAMINADAS CON RELAVES MINEROS"** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18, calificativo: Aprobado con mención honrosa

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo** a **DIEGO MACEDO PRADA** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 17:00 horas se levantó la sesión.


Ciudad Universitaria, 09 de enero de 2019.



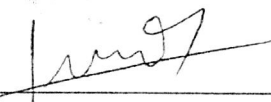
Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA
(PRESIDENTE)



Mg. TITO SANCHEZ ROJAS
(ASESOR)



Dr. PABLO RAMIREZ ROCA
(MIEMBRO)



Blgo. DANIEL ORE CHAVEZ
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a todas aquellas personas que siempre me apoyaron. En momentos de amargura y alegría. A las carencia y abundancia. A los amigos que confiaron en mí.

A la familia que siempre fueron incondicionales, Madre, Padre, hermanos y Tío.

A los altibajos, buenos y malos; al desarrollo de la investigación y al investigador. A la confianza que deposito en mí, mi querido asesor.

En familia, en nuestra casa, en nuestro hogar, en nuestro laboratorio agradezco a todas las personas que estuvieron en el laboratorio de microbiología Ambiental y Biotecnología.

Todos ellos forjan dentro de mí el carácter del mañana.

Por el camino de la investigación lleno de ensayos y errores, de muchas horas de lecturas, de experiencias, de aprendizaje tanto cognitivo como espiritual, de las relaciones intrapersonales como interpersonales. Todas ellas engloban el camino de la investigación de la ciencia que nos rodea a todos los individuos de esta presente existencia. El camino del investigador, de aquel niño de 5 años que se maravilla con el mundo, la búsqueda inalcanzable del porque y del perfeccionamiento del conocimiento, de la creación y destrucción de paradigmas.

Mis agradecimientos a mi asesor, profesor Tito Libio Sánchez Rojas, al profesor Daniel Saúl Ore, profesor Abad Flores a mi compañero tesista Lee Kent Aquise Arrieta, al grupo del laboratorio Magerlyn Huamantalla, Hammerly Lino, Christian Davila y a mi compañera Diana Alonso Ochoa; a los practicantes del laboratorio Jean-Paul y Ana Paula.

Laboratorio 207 genética Marlon Garcia, Ingrid Tirado y Paul Guarnizo. Por las fotos tomadas de los geles de poliacrilamida para los resultados de la presente tesis.

A mis compañeros de otros laboratorio Yerson, Gregory, Jordan, Miguel.

El presente trabajo se realizó dentro del Proyecto: *“Monitoreo y evaluación de la calidad del agua en cabecera de cuenca del Río Rímac, lagos y lagunas de la Región Central del Perú para determinar organismos indicadores y marcadores moleculares de contaminación por metales pesados”* financiado por el Fondo para la Innovación, Ciencia y Tecnología (FINCyT), Programa Nacional para la Innovación y Competitividad en la Producción (PNICP), Convenio N° 391-PNICP-PIAP-2014, realizado en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

Página

1.INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Metal pesado.....	3
2.2 Biomarcadores	3
2.3 Biosensores	7
2.4 Marcador molecular.....	7
2.5 Transportador ABC	9
2.6 Cebador CODEHOP	10
2.7 Generalidades de los fungi	11
2.7.1 Levaduras.....	11
2.7.2 Ascomycetes	12
2.7.3 Basidiomycetes	13
2.7.4 Microorganismos extremófilos	15
2.7.5 Levaduras acidófilas	15
2.7.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo de expresión de genes.....	16
2.8 Mecanismo de resistencia en microorganismos a metales pesados	17
2.8.1 Biosorción.....	21
2.8.2 Bioadsorción.....	21
2.8.3 Bioabsorción.....	22
2.9 Biorremediación.....	23
2.10 Generalidades toxicológicas	23
2.10.1 Tolerancia	24
2.10.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI)	24
2.10.3 Concentración letal	24

	Página
2.10.4 Dosis de exposición	25
2.10.5 Respuesta tóxica	25
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	26
3.1 Pregunta de investigación	26
3.2 Hipótesis y variable de investigación.....	26
3.3 Objetivos	26
3.3.1 Objetivo general	26
3.3.2 Objetivos específicos.....	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
4.1 Estaciones de muestreo	27
4.2 Monitoreo de los cuerpos de agua	32
4.3 Aislamiento de levaduras extremófilas	33
4.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria	33
4.5 Determinación de la cinética de crecimiento.....	34
4.6 Determinación de la concentración letal (CL ₅₀) frente a metales pesados	34
4.7 Extracción de ácidos nucleicos.....	35
4.7.1 Extracción de ADN	35
4.7.2 Estandarización de la extracción de ARN	36
4.8 Búsqueda de genes	37
4.8.1 Genes de expresión diferenciada en levaduras	38
4.8.2 Levaduras reportadas en lagunas contaminadas por metales pesados o ensayos de resistencia	38
4.8.3 Búsqueda de regiones homologas por Blastp en levaduras	38
4.8.4 Búsqueda de regiones homologas por Blastp en levaduras reportadas en lagunas contaminadas por metales pesados o ensayos de resistencia	38
4.8.5 Metalotioneínas en levaduras (CUP1)	38
4.8.6 Fitoquelatinas (PCR1), cistationina beta sintasa (CYS4), factor de transcripción de dedos de zinc (ACE2).....	39

4.8.7 Control endógeno ACT1	39
4.9 Diseño de cebadores	39
4.9.1 Diseño de cebadores por consenso degenerado de oligo primers (CODEHOP)	39
4.9.2 Diseño de cebadores no degenerados	41
4.10 Caracterización molecular de levaduras por reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	41
4.11 Amplificación de los cebadores diseñados por reacción en cadena de la polimerasa.....	41
4.12 Estandarización de la síntesis de DNAC a partir del ARNm.....	42
5. RESULTADOS	43
5.1 Determinación de los parámetros físicoquímicos de los cuerpos de agua.....	43
5.2 Aislamiento de levaduras extremófilas.....	46
5.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria frente a metales pesados	48
5.4 Determinación de la cinética de crecimiento.....	49
5.5 Determinación de la concentración letal frente a metales pesados	50
5.6 Extracción de ácidos nucleicos.....	51
5.6.1 Extracción de ADN	51
5.6.2 Estandarización de la extracción de ARN	53
5.7 Búsqueda de genes	54
5.7.1 Genes de expresión diferencial en levaduras	54
5.7.2 Levaduras reportadas en lagunas contaminadas por metales pesados o ensayos de resistencia	56
5.7.3 Búsqueda de regiones homologas por Blastp en levaduras	56
5.7.4 Búsqueda de regiones homologas por Blastp en levaduras reportadas en lagunas contaminadas por metales pesados o ensayos de resistencia	57
5.7.5 Metalotioneínas en levaduras (CUP1)	60

5.7.6 Fitoquelatinas (PCR1), cistationina beta sintasa (CYS4), factor de transcripción de dedos de zinc (ACE2).....	60
5.7.7 Control endógeno ACT1	60
5.8 Diseño de cebadores	61
5.8.1 Diseño de cebadores por consenso degenerado de oligo primers CODEHOP	61
5.8.2 Diseño de cebadores no degenerados	62
5.9 Caracterización molecular de levaduras por reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	63
5.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de los cebadores diseñados.....	66
5.11 Estandarización de la síntesis de DNAC a partir del ARNm	69
6. DISCUSIÓN	70
7. CONCLUSIONES.....	83
8. RECOMENDACIONES	84
9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	85
10. ANEXOS	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Toxicidad de los metales pesados en seres vivos.
Tabla 2:	Georreferenciación en coordenadas UTM y altitud de las estaciones de muestreo.
Tabla 3:	Parámetros fisicoquímicos de las estaciones muestreadas. Santa Catalina, Lago Junín, Huacracocha, Yanamate, Milpo y Quiulacocha.
Tabla 4:	Resultados del análisis de metales pesados de las muestras obtenidas de cuerpos de agua Altoandinos de la Región Cerro de Pasco.
Tabla 5:	Levaduras aisladas de los cuerpos de aguas contaminadas por metales.
Tabla 6:	Determinación de la concentración de ácidos nucleicos y absorbancia.
Tabla 7:	Determinación de la concentración de ácidos nucleicos (ARN).
Tabla 8:	Genes seleccionados para el diseño de cebadores como potenciales marcadores. Genes de expresión diferencial mayor a 2.5
Tabla 9:	Genes seleccionados para el diseño de cebadores como potenciales marcadores. Genes de expresión diferencial menor a -2.5
Tabla 10:	Levaduras reportadas en lagunas contaminadas o ensayos de resistencia y sus referencias bibliográficas respectivas.
Tabla 11:	Genes de expresión diferencial mayor a 2.5 y especies reportadas.
Tabla 12:	Genes de expresión diferencial menor a 2.5 y especies reportadas.
Tabla 13:	Cebadores degenerado diseñados a partir de los genes seleccionados como potenciales marcadores de expresión frente a metales pesados.

Tabla 14:	Cebadores no degenerados diseñados a partir de los genes Cup1 y Act como potenciales marcadores
Tabla 15:	Identificación molecular mediante marcadores de la región LSU D1/D2 subunidad mayor ribosomal.
Tabla 16:	Concentración de ácidos nucleicos de ADNc a partir del ARNm.
Tabla 17:	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a metales pesados.
Tabla 18:	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a metales pesados.
Tabla 19:	Cinética de crecimiento de la cepa 2LJJ1.
Tabla 20:	Porcentaje de células viables de la levadura 2LJJ1 frente a metales pesados.
Tabla 21:	Genes seleccionados con mayor expresión diferencial en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> frente a metales pesados.
Tabla 22:	Secuencias utilizadas para el diseño de cebadores.
Tabla 23:	Análisis de los parámetros fisicoquímicos de los cebadores. El análisis se realizó en la web: Oligoanalyzer integrated DNA technologies (IDTDNA).
Tabla 24:	Descripción de los genes de resistencia a metales pesados reportados en Saccharomyces Genome Database (SGD).

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Diseño de los cebadores por estrategia CODEHOP.
- Figura 2: Ascospora *Byssonectria terrestris*, Denmark (× 3500).
- Figura 3: Espora de basidio, *Hygrocybe conica*, Denmark.
- Figura 4: Modelo de mecanismos de resistencia a metales pesados por levaduras.
- Figura 5: Homeostasis en células enfrentadas a diferentes concentraciones de cadmio (II).
- Figura 6: Cuenca del Mantaro. Autoridad Nacional del Agua. Ministerio de Agricultura y Riego.
- Figura 7: Cuenca del Río Rímac. Autoridad Nacional del Agua. Ministerio de Agricultura y Riego.
- Figura 8: Estaciones de muestreo en el Lago Chinchaycocha.
- Figura 9: Estaciones de muestreo de la laguna Yanamate.
- Figura 10: Estación de muestreo de la relavera Milpo.
- Figura 11: Mapa de la laguna Santa Catalina y Huacracocha.
- Figura 12: Flujograma de Búsqueda de genes.
- Figura 13: Cepa 2LQCP4. *Rhodotorula mucilaginosa*
- Figura 14: Cepa 2RYP9. *Rhodotorula toruloides*
- Figura 15: Cepa 2RMP3. *Rhodotorula mucilaginosa*
- Figura 16: Cepa 4LYP0. *Meyerozyma guilliermondii*

[Escriba aquí]

- Figura 17: Cepa 2LHJ2. *Meyerozyma guilliermondii*
- Figura 18: Cepa 2LJJ6. *Yarrowia lipolytica*
- Figura 19: Determinación de la concentración mínima inhibitoria.
- Figura 20: Cinética de crecimiento de la cepa 2LJJ1.
- Figura 21: Cinética de crecimiento fase exponencial. Tiempo (h) vs Log (UFC/mL).
- Figura 22: Porcentaje de células viables vs concentración metal (ppm).
- Figura 23: Electroforesis de la extracción de ADN.
- Figura 24: Electroforesis de la extracción de ARN en condiciones de CL50 frente a metales pesados.
- Figura 25: Filogenia Molecular a partir del marcador de la subunidad mayor ribosomal LSU D1/D2 de las levaduras aisladas.
- Figura 26: Tamaño de los amplicones de región LSU D1/D2 de la subunidad ribosomal 28S de las levaduras aisladas.
- Figura 27: Amplicones del gen ACE2.
- Figura 28: Amplicones del gen GPH1.
- Figura 29: Amplicones del gen ACT1 Y CUP1.
- Figura 30: Monitoreo Laguna Santa Catalina.
- Figura 31: Monitoreo Laguna Yanamate.
- Figura 32: Monitoreo Laguna Huacracocho.
- Figura 33: Monitoreo Laguna Milpo.
- Figura 34: Estaciones del monitoreo de lagos y lagunas de la sierra central del Perú - proyecto FINCYT 2014.
- Figura 35: Tinción de Gram de la levadura 2LJJ1

[Escriba aquí]

- Figura 36: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del gen ATM1.
- Figura 37: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen ATM1.
- Figura 38: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del gen CYS4
- Figura 39: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen CYS4.
- Figura 40: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del gen GPH1.
- Figura 41: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen GPH1.
- Figura 42: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del gen PCR1.
- Figura 43: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen PCR1.
- Figura 44: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del gen ENA1.
- Figura 45: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen ENA1.
- Figura 46: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del gen ACE2.
- Figura 47: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen ACE2.
- Figura 48: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen ACT.
- Figura 49: Flujograma de trabajo para el diseño de marcadores moleculares de metales pesados en cuerpos de aguas continentales.

ABREVIATURAS

NCBI	: National Center for Biotechnology
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BLASTn	: Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide
NGS	: Next Generation Sequencing
SGD	: Saccharomyces Genome Database
ADN	: Acido desoxirribonucleico
ARN	: Ácido ribonucleico
MCLAB	: Molecular Cloning Laboratories
SC	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
IDTDNA	: Integrated DNA Technologies DNA
YPG	: Yeast Peptone Glucose
LSU	: Large sub unit
MAURIVIN	: AB Biotek (Mauri Yeast Australia)
CL	: Concentración Letal
CODEHOP	: Consensus Degenerate Hibrid Oligo Primer
CDS	: Coding sequences
NGS	: Next Generation Sequence
MT	: Metalotioneínas

[Escriba aquí]

RESUMEN

En la actualidad el Perú es considerado un potencial minero de cobre, zinc, hierro, estaño, plata, oro entre otros. Lo cual tiene un impacto positivo en la economía nacional, mejorando los índices macroeconómicos en las últimas décadas. Sin embargo, dichas actividades mineras generan problemas en zonas Altoandinas, donde se realiza estas actividades mineras. La problemática abarca desde el ámbito social y ambiental, con impactos negativos en los ecosistemas terrestres y acuáticos, afectando la calidad del agua, transformando lagunas en depósitos de relaves mineros, alterando la cadena trófica que rodean las lagunas contaminadas y capa freática. Los monitoreos fueron realizados en las lagunas Huacracocho, Santa Catalina, lago Junín, relaveras Yanamate y Quiulacocha. Se aislaron 11 cepas de levaduras, identificadas molecularmente mediante marcadores de la región LSU D1/D2 de la subunidad mayor ribosomal 28S. Las cepas identificadas fueron *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula toluroides*, *Meyerozyma guilliermondii* y *Pichia fermentans*. Se seleccionó la levadura que presentó la mejor resistencia según CMI para cobre y cadmio, se realizó la cinética de crecimiento, se encontró la fase logarítmica alrededor de las 78 horas. Así mismo se determinó la concentración letal media (CL50) con estos metales. Se diseñaron cebadores para determinar la presencia de los genes CUP1, ATM1, ACE2, ACT, GPH1, ENA1, CYS4 con la finalidad de determinar la presencia de estos marcadores moleculares en nuestras levaduras aisladas, y determinar la predominancia en los diferentes taxones aislados de cuerpos de agua Altoandinos en la sierra central del Perú. Se concluyó que los genes CUP1, ACE2, GPH1, ACT están presentes en las levaduras de la zona, y los cebadores diseñados podrían ser utilizados para la búsqueda de potenciales marcadores moleculares de expresión diferencial frente a estos metales pesados.

Palabras clave: Levadura, relaves mineros, cebadores, marcadores moleculares.

SUMMARY

At present Peru is considered a potential mine of copper, zinc, iron, tin, silver, gold among others. This has a positive impact on the national economy, improving macroeconomic indices in recent decades. However, these mining activities generate problems in the Andean highlands, where these mining activities are carried out. The problem covers from the social and environmental scope, with negative impacts on the terrestrial and aquatic ecosystems, affecting water quality, transforming lagoons into deposits of mine tailings, altering the trophic chain that surrounds the polluted lagoons and water table. The monitoring was carried out in the lagoons Huacracocho, Santa Catalina, Lake Junín, Yanamate and Quiulacocha tailings. We isolated 11 yeast strains, molecularly identified by markers of the LSU D1 / D2 region of the 28S ribosomal major subunit. The strains identified were *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula toluroides*, *Meyerozyma guilliermondii* and *Pichia fermentans*. The yeast that showed the best resistance according to CMI for copper and cadmium was selected, the growth kinetics were performed, the logarithmic phase was found around 78 hours. Likewise, the mean lethal concentration (LC50) was determined with these metals. Primers were designed to determine the presence of the genes CUP1, ATM1, ACE2, ACT, GPH1, ENA1, CYS4 in order to determine the presence of these molecular markers in our isolated yeasts, and to determine the predominance in the different taxa isolated from bodies. of Altoandinos water in the central highlands of Peru. It was concluded that the genes CUP1, ACE2, GPH1, ACT are present in the yeasts of the zone, and the designed primers could be used for the search of potential molecular markers of differential expression against these heavy metals.

Key words: Yeast, drainage water, gen, marker

1. INTRODUCCIÓN

La actividad minera en el Perú se ha realizado desde épocas preincaicas hasta la actualidad, en las últimas décadas han mejorado los precios de los metales preciosos a nivel mundial, en dicha coyuntura nuestro país exportador de esta materia prima está aún inmerso en un auge económico minero. Asimismo la actividad minera representa el 10% del producto bruto interno (PBI) (MEM, 2013). Estas actividades mineras generan impactos negativos en el ambiente, a través del tiempo se han generado gran cantidad de Pasivos Ambientales Mineros (PAMs), que se ubican a lo largo de todo el territorio peruano sobre todo en zonas Andinas y Altoandinas. Constituyen un serio riesgo para la salud y son causa de conflictos socio ambientales en las comunidades, se sabe que alrededor del 60% de conflictos sociales están relacionados con el agua (Glave, 2007).

La inadecuada disposición de relaves líquidos y sólidos, así como los métodos inapropiados para la disposición de efluentes peligrosos y materiales contaminantes, han causado impactos negativos por las filtraciones de los drenajes ácidos en cuerpos acuíferos y quebradas (OEFA, 2015), así mismos efectos negativos en comunidades y ecosistemas. Algunas actividades mineras desarrolladas en la sierra central han contaminado cuerpos de agua que drenan al río Rímac, contaminando con metales pesados las fuentes de agua potable, que abastecen la región de Lima Metropolitana donde habitan más de 9 millones de personas (Banco Mundial, 2005).

La Agencia de Protección Medioambiental (EPA) de los Estados Unidos de América del Norte, sitúa a los metales pesados entre los contaminantes más peligrosos para la salud. Por ejemplo, el cadmio está considerado como un carcinógeno de categoría 1 (Hill, 2004). Las empresas mineras ubicadas en cabecera de cuenca afectan a las lagunas depositando relaves mineros, donde nacen los ríos. Se ha registrado para el río Rímac, contaminación de diversos metales pesados como cobre (Cu), plomo (Pb), cadmio (Cd), arsénico (As) (Sedapal, 2004; Digesa, 2004).

La exposición a altas concentraciones de metales pesados puede ocasionar la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno en los organismos, induciendo la síntesis de enzimas antioxidantes como la catalasa y superóxido dismutasa. En consecuencia, aumenta la expresión de proteínas por el aumento de metales (Aránguiz *et al.*, 2009).

En el presente estudio, se procesaron diversas muestras provenientes de relaves mineros con altas concentración de metales con el objetivo de aislar levaduras en condiciones extremofilas. Las proteínas como las metalotioneínas (MTs), se inducen por una gran variedad de estímulos o en condiciones de estrés químico, como los metales pesados, agentes oxidantes, entre otras sustancias, estas actúan como señales de estrés celular (Kägi 1993; Haq, *et al.*, 2003). Una vez dentro de la célula el metal pesado, puede unirse a un ligando al azufre del glutathione (GSH) o fitoquelatinas (PCs) y ácidos orgánicos como el citrato (Clemens, 2006). Para ello la expresión de las MTs está regulada principalmente a nivel transcripcional, debido a la existencia de elementos de respuesta en la región promotora de los genes que las codifican, en los cuales se pueden unir distintos factores de transcripción que están implicados en la expresión basal y en la activación de la transcripción (Andrews, 2000).

Las ATPasas participan en la transferencia de algunos metales, relacionados con un grupo de genes, que codifican factores de regulación como: *cadA* (cadmio), *arsB* (arsénico), *merA* (mercurio), *cusA* (cobre), *chrA* (cromo), entre otros. Gross, *et al.*, 2000, utilizaron a *Saccharomyces cerevisiae*, como modelo de expresión de genes, demostró que los iones cobre regulan la expresión génica a través de dos activadores transcripcionales: Ace1 y Mac1. En presencia de altas concentraciones de cobre se induce la expresión del gen Ace1. A diferencia del Mac1, que activa un subconjunto de genes en deficiencia de cobre. La búsqueda de marcadores moleculares en microorganismos aislados de cuerpos de agua contaminadas con metales pesados, en cabecera de cuenca de regiones Altoandinas, nos permitirá evaluar y determinar la presencia de marcadores moleculares en estos microorganismos aislados.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Metal pesado

Actualmente, la contaminación por metales pesados es un problema ambiental importante porque los iones metálicos persisten en el medio ambiente debido a su naturaleza recalcitrante. La tendencia a la toxicidad y bioacumulación de los metales pesados son una grave amenaza para la salud de los organismos vivos dentro de la cadena trófica. Este proceso se le conoce como biomagnificación. En contraste con los contaminantes orgánicos, los metales pesados no pueden descomponerse por procesos químicos o biológicos. Por lo tanto, ellos sólo pueden transformarse en especies menos tóxicas (Mani y Kumar, 2014).

2.2 Biomarcadores

La mayoría de los metales pesados son tóxicos en bajas concentraciones y son capaces de ingresar a la cadena trófica, donde se acumulan y causan daño a los organismos (tabla 1), los metales tienen el potencial de exhibir efectos nocivos en altas concentraciones, y la toxicidad de cada metal depende de la cantidad disponible para los organismos, la dosis absorbida, la ruta y la duración de la exposición.

Se define como la medida de fluidos corporales, moléculas, células, tejidos o individuos que indican en términos bioquímicos y/o celulares la presencia/ausencia de contaminantes. Además, permite cuantificar la respuesta del individuo frente al estrés que el ambiente presenta. Aquellos organismos que son evaluados presentan niveles de toxicidad como respuesta biológica causada por el contaminante (Livingstone, 1993).

Tabla 1. Toxicidad de los metales pesados en seres vivos (Ayangbenro & Babalola, 2017)

METAL	FUENTE DE CONTAMINACIÓN	EFEECTO EN HUMANOS	EFECTOS EN PLANTAS	EFEECTO EN MICROORGANISMOS
Mercurio (Hg)	Baterías, combustión de carbón, actividades geotérmicas, minería, industrias de pintura, industria del papel, erupción volcánica, meteorización de rocas.	Ataxia, déficit de atención, ceguera, sordera, disminución de la tasa de fertilidad, demencia, mareos, disfasia, irritación gastrointestinal, gingivitis, problema renal, pérdida de memoria, edema pulmonar, inmunidad reducida, esclerosis.	Afecta el sistema antioxidante, afecta la fotosíntesis, mejora la peroxidación de los lípidos, efecto genotóxicos inducido. Inhibición del crecimiento celular, la captación de nutrientes y la homeostasis.	Muerte celular, desnaturalización de la proteína, interrupción de la membrana celular e inhibición de la función enzimática.
Plomo (Pb)	Combustión de carbón, galvanoplastia, fabricación de baterías, minería, pintura, pigmentos.	Anorexia, nefropatía crónica, daño a las neuronas, presión arterial alta, hiperactividad, insomnio, déficit de aprendizaje, fertilidad reducida, daño al sistema renal, factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer, atención acortada.	Afecta la fotosíntesis y el crecimiento celular, clorosis, inhibición de la actividad enzimática y germinación de semillas, estrés oxidativo.	Desnaturalización de ácidos nucleicos y proteínas, inhibición de la actividad enzimática y los factores de transcripción.
Nickel (Ni)	Galvanoplastia, metal no ferroso, pinturas, esmaltado de porcelana.	Enfermedades cardiovasculares, dolor de pecho, dermatitis, mareos, tos seca y dificultad para respirar, dolor de cabeza, enfermedades renales, pulmonares y cáncer nasal, náuseas.	Disminución del contenido de clorofila, inhibición de la actividad enzimática y el crecimiento celular, reducción de la absorción de nutrientes.	Desorganización de la membrana celular, inhibición de la actividad enzimática, estrés oxidativo.
Selenio (Se)	Combustión del carbón, minería.	Disfunción del sistema endocrino, trastornos gastrointestinales, deterioro de la salud, daño hepático.	Desnaturalización de las proteínas, reducción de la biomasa.	Inhibición de la tasa de crecimiento

METAL	FUENTE DE CONTAMINACIÓN	EFEECTO EN HUMANOS	EFFECTOS EN PLANTAS	EFEECTO EN MICROORGANISMOS
Plata (Ag)	Fabricación de baterías, minería, procesamiento fotográfico, fundición.	Argiria y argiriosis, bronquitis, efecto citopatológico en fibroblastos y queratinocitos, enfisema, anudamiento de cartílago, fatiga mental, nariz, garganta e irritación del pecho, reumatismo.	Afecta la homeostasis, disminución del contenido de clorofila, inhibición del crecimiento.	Lisis celular, inhibir la célula transducción y crecimiento.
Talio (Tl)	Producción de cemento combustión de combustibles fósiles, fundición de metales, refinación de petróleo.	Alopecia, ataxia, síndrome de pies ardientes, convulsiones, delirio, fatiga, gastroenteritis, caída de cabello, alucinaciones, dolor de cabeza, hipotensión, insomnio, náuseas, taquicardia, vómitos.	Inhibición de la actividad enzimática crecimiento reducido.	Daño del ADN, inhibición de la actividad enzimática y el crecimiento celular.
Zinc (Zn)	Fabricación de latón, minería, refinación de petróleo, fontanería.	Ataxia, depresión, irritación gastrointestinal, hematuria, ictericia, impotencia, falla de riñón e hígado, letargo, degeneración macular, humo de metal, fiebre, cáncer de próstata, convulsiones, vómitos.	Inhibición de la fotosíntesis, la tasa de crecimiento, reducción del contenido de la clorofila, tasa de germinación y la biomasa de la planta.	Muerte, disminución de la biomasa, inhibición del crecimiento celular.
Antimonio (Sb)	Combustión de carbón, minería, fundiciones, erosión del suelo, erupción volcánica.	Cáncer, enfermedades cardiovasculares, conjuntivitis, dermatitis, enfermedades hepáticas, ulceración nasal, enfermedades respiratorias.	Disminución de la síntesis de algunos metabolitos, inhibición del crecimiento, inhibición de la síntesis de clorofila.	Inhibición de la actividad enzimática y reducción de la tasa de crecimiento.
Arsénico (As)	Deposición atmosférica, minería, pesticidas, sedimentación de roca, fundición.	Daño cerebral, desorden cardiovascular y respiratorio, conjuntivitis, dermatitis, cáncer de piel.	Daño de la membrana celular, inhibición del crecimiento, inhibición de la extensión y proliferación de las raíces,	Desactivación de enzimas.

METAL	FUENTE DE CONTAMINACIÓN	EFEECTO EN HUMANOS	EFECTOS EN PLANTAS	EFEECTO EN MICROORGANISMOS
			interfiere con los procesos metabólicos críticos, pérdida de fertilidad, pérdida del rendimiento y producción de frutas, estrés oxidativo, trastornos fisiológicos.	
Berilio (Be)	Polvo volcánico, combustión del carbón y petróleo.	Reacciones alérgicas, beriliosis, cáncer, enfermedades cardíacas, enfermedades pulmonares.	Inhibición de la germinación de la semilla.	Aberración cromosómica, mutaciones.
Cadmio (Cd)	Fertilizante, minería, pesticida, plástico, refinación, soldadura.	Enfermedad ósea, tos, enfisema, dolor de cabeza, hipertensión, enfermedad ósea itai-itai, enfermedades renales, cáncer de pulmón y próstata, linfocitosis, anemia hipocrómica microcítica, atrofia testicular, vómitos.	Clorosis, disminución de nutrientes en la planta, inhibición del crecimiento, reducción de la germinación de la semilla.	Daño de ácidos nucleicos, desnaturalización de proteínas, inhibición de la división celular y los factores de transcripción.
Cromo (Cr)	Teñido, galvanoplastia, producción de pinturas, fabricación de acero, textil.	Bronconeumonía, bronquitis crónica, diarrea, enfisema, dolor de cabeza, irritación de la piel, picazón de las vías respiratorias, las enfermedades hepáticas, el cáncer de pulmón, náuseas, insuficiencia renal, toxicidad para la reproducción, vómitos.	Clorosis, retraso, senescencia, marchitamiento, lesiones bioquímicas, reducción de la germinación, crecimiento atrofiado, estrés oxidativo.	Elongación de la fase de retraso, inhibición del crecimiento e inhibición de la absorción de oxígeno.
Cobre (Cu)	Pulido de cobre, minería, pintura, chapado, impresión.	Dolor abdominal, anemia, diarrea, dolor de cabeza, hígado y daño renal, trastornos metabólicos, náuseas vómitos.	Clorosis, estrés oxidativo, retarda el crecimiento celular.	Interrupción de la función celular e inhibición de la actividad enzimática.

2.3 Biosensores

En microorganismos acidófilos, la resistencia producida a metales pesados es considerado como el rasgo fenotípico más adecuado para la selección de genes indicadores de contaminación por metales pesados y ser utilizado como biosensor (Banerjee, 2004).

En términos generales, "biosensor" se refiere a cualquier sistema que detecta la presencia de un sustrato mediante el uso de un componente biológico (Livingstone, 1993). Este, proporciona una señal que se puede cuantificar.

Por ejemplo, los biosensores a nivel molecular como la prueba ELISA. En el cual se utiliza anticuerpos para la unión a una macromolécula específica que puede estar conjugada, a una enzima, liberando productos, cuando reacciona con un sustrato, el conjugado se comporta como un biosensor dentro de un sistema de reacciones antígeno-anticuerpo.

2.4 Marcador molecular

Los marcadores moleculares se han utilizado como herramientas para responder preguntas que van desde la diversidad de las especies, la historia evolutiva de las poblaciones, los polimorfismos genéticos dentro de una misma especie, patrones de expresión genética cual puede variar entre poblaciones estrechamente relacionadas y muchos otros aspectos de las respuestas del organismo al entorno que lo rodea (estrés oxidativo, ausencia de nutrientes, altas temperaturas, entre otras). Sin embargo, las definiciones no alcanzan en el ámbito ambiental; es necesario más estudios a nivel de respuesta del individuo y/o poblaciones con su entorno. Las definiciones más cercanas a un marcador molecular desde el punto de vista de respuesta al ambiente se presentan de la siguiente manera:

Por ejemplo, en uno de los primeros estudios ecológicos moleculares, O'Brien y sus colegas (1983) encontraron que la diversidad genética entre guepardos en Sudáfrica era extremadamente baja. Para comprobar sus resultados, O'Brien *et al.*, (1985) trasplantaron injertos de piel entre diferentes guepardos y encontraron que los guepardos eran genéticamente similares, sus sistemas inmunes no rechazaban los injertos de tejido. Este y otros estudios iniciales desencadenaron el debate, que continúa hoy, sobre la importancia de la diversidad genética para la persistencia de una población y cómo la diversidad genética está relacionada con el cambio ambiental. Si cada organismo en una población tiene la misma composición genética, es probable que responda de la misma manera a cualquier cambio ambiental. Si este cambio ambiental dificulta la capacidad de supervivencia o reproducción de un organismo, es probable que todos los individuos genéticamente similares de la población se vean afectados de la misma manera, lo que aumenta las posibilidades de extinción (O'Brien *et al.*, 1988).

Desde el punto de vista de la ingeniería genética-biotecnología ambiental, para la selección de un marcador molecular. Se selecciona aquella cepa que es afectada por el marcador. Es importante que las características conferidas por un marcador molecular no sean exhibidas por la población indígena en el sistema que se estudia. Para que un marcador molecular sea aplicable, debe ser simple de detectar, altamente sensible y rentable. El producto del marcador debe mostrar una interferencia mínima con el sistema ambiental y con los procesos fisiológicos dentro de la célula. La expresión del gen marcador no debe colocar una carga metabólica en la bacteria huésped; los marcadores se han diseñado con promotores inducibles para reducir la carga metabólica (Winstanley *et al.*, 1991).

Desde un punto de vista de respuesta al ambiente, son aquellos cambios biológicos que pueden ocurrir en respuesta a contaminantes y a factores naturales (temperatura,

salinidad, etc.). Sin embargo, la esencia de los biomarcadores moleculares, es su especificidad frente a una determinada respuesta. Por, ejemplo, en el caso de las metalotioneínas (MT) en *Saccharomyces cerevisiae*, responde de forma específica a altos niveles de Cobre. El ingreso del ion cobre al citosol es mediado por proteínas transportadoras que pertenecen a la superfamilia ABC. En presencia del ion cobre, se activan factores de transcripción, como el Ace2. Estos factores de transcripción activan al gen Cup1 que codifica las metalotioneínas en presencia del ion de cobre. Estas metalotioneínas atrapan los iones de cobre. Asimismo, responden a la unión del glutatión con un agente oxidante. La unión ocurre a nivel intracelular, para luego transportarlas a una vacuola, donde se inactiva al agente oxidante.

Por lo tanto, los marcadores moleculares pueden diagnosticar con precisión la presencia o ausencia de algún contaminante en organismos expuestos (Moore y Simpson, 1992). Estos diagnósticos de condiciones de exposición, nos da una mayor comprensión de las respuestas moleculares y vincularlas a eventos biológicos perjudiciales de orden superior.

2.5 Transportadores ABC

Los transportadores ABC son una gran familia de proteínas involucradas en el transporte de una amplia variedad de diferentes compuestos, como azúcares, iones, péptidos y moléculas orgánicas más complejas. El dominio de unión a nucleótidos muestra la mayor similitud entre todos los miembros de la familia. Los transportadores ABC son un subconjunto de proteínas transportadoras hidrolasas que contienen un motivo, Q-loop y H-loop / región de cambio. Asimismo, estos dominios de unión se encuentran en contacto con las moléculas de ATP y GTP para su hidrólisis y liberación de energía, (Marchler-Bauer, 2017). Se reporta que esta familia transporta iones metálicos como el As^{+5} , Cr^{+6} , y Hg^{+2} (Satyanarayana et al., 2013)

2.6 Cebador CODEHOP

El cebador CODEHOP consiste en un conjunto de cebadores que tienen secuencias variables en la región 3', esta región se denomina núcleo degenerado. Donde cada cebador proporciona uno de las posibles combinaciones de los codones que codifican un mismo aminoácido conservado y específico. Este conjunto de cebadores se le conoce como bloque secuencias. Además, cada cebador en el grupo tiene una región homóloga de consenso en la región 5'. Esta región homóloga deriva del nucleótido más probable en cada posición codificando los aminoácidos conservados que flanquean a la secuencia que se desea amplificar. La homología se puede definir en base a la igualdad de las secuencias aminoacídicas, y nos permite identificar genes ortólogos en los genomas.

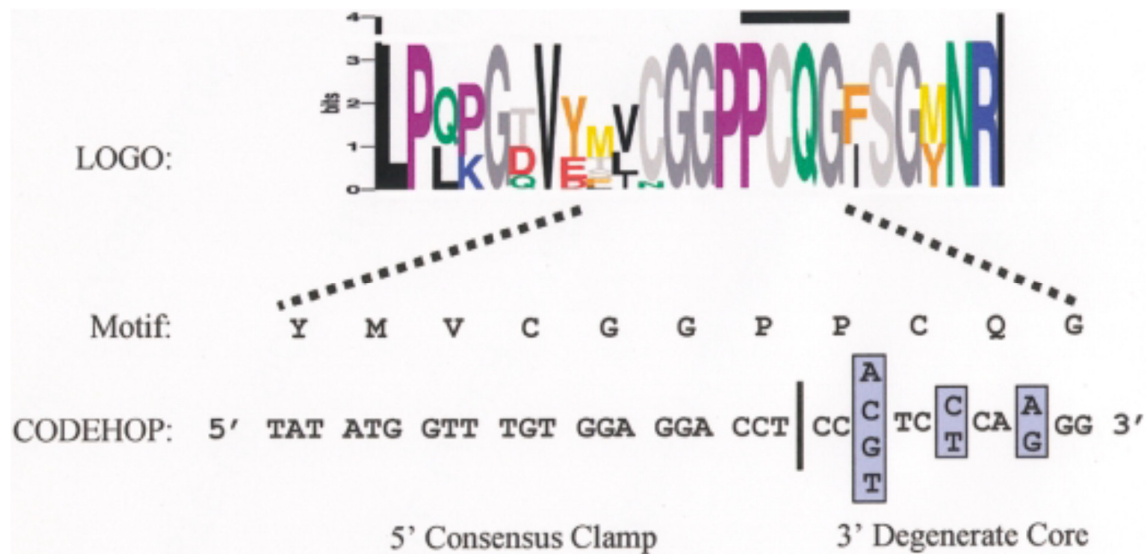


Figura 1. Diseño de los cebadores por método CODEHOP (Consensus Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer). Se muestra el diseño de un cebador, en el cual se observa que las secuencias nucleotídicas poseen 2 regiones: la región consenso y el núcleo degenerado. La región consenso inicia del cebador 5' y se diseña partir de la homología de los aminoácidos más probables. Por otro lado, tenemos el núcleo degenerado se diseña en la región 3' del cebador y parte de las secuencias nucleotídicas homólogas, estas secuencias se agrupan en codones que codifican para un mismo aminoácido, como se observa el triplete de nucleótidos varia en la tercera letra, estas variaciones son el rasgo distintivo para que el cebador sea considerado degenerado. (Rose *et al*, 2003)

2.7 Generalidades de los hongos.

2.7.1 Levaduras

Las levaduras siempre deben estar aptas para protegerse ellas mismas del estrés ambiental para continuar sobreviviendo, creciendo y multiplicándose. Por ejemplo, la fermentación del azúcar causa estrés intracelular (Hohmann y Mager, 2003) produciéndose una elevada concentración de etanol y pH. Para sobrevivir y multiplicarse en condiciones dramáticamente variables, los microorganismos como las levaduras han

desarrollado un mecanismo complejo de detección y señalización que les permiten adaptar su fisiología a las nuevas condiciones impuestas por el ambiente que las rodea. Dentro de las levaduras más conocida es la *Saccharomyces cerevisiae*. Tanto por su uso ancestral en la fermentación e industria. Hasta la actualidad, como organismo modelo de estudio de la biología molecular. Sin embargo, *Saccharomyces cerevisiae* no es la única levadura que hay en nuestro ambiente. Tenemos una amplia diversidad de levaduras que se puede clasificar dentro de los fungi como Ascomycetos y Basidiomycetos. Ascomycetos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Meyerozyma guilliermondii* o *Pichia fermentans*. Basidiomycetos como *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula toluroides*.

2.7.2 Ascomycetos

El grupo más grande de hongos también conocido como Ascomycota o Ascomycetos. La principal característica para definir a los Ascomycota es su producción de esporas sexuales en células llamadas ascas, que a su vez, están conformados por ascosporas (Petersen, 2013). Estas células se encuentran, normalmente, en un tejido llamado himenio. Aquí las ascosporas se sientan paralelas entre sí, a menudo entremezclado con hifas llamadas parafisos. Si el himenio está coloreado, el pigmento está a menudo en las puntas de los parafisos. Una sola asca, usualmente, contiene ocho esporas aunque el número puede variar de uno a varios miles.



Figura 2. Ascospora *Byssonectria terrestris*, Denmark (× 3500)

Los Ascomicetos están conformados por sesenta y cinco miles de especies descritas. La mayoría de estos pueden formar cuerpos fructíferos. Algunos de estos son diminutos mientras que otros, son bastante más grandes. Históricamente, los Ascomycota están divididos en grupos basados en apariencia de los cuerpos fructíferos: discomycetes, las especies con cuerpos fructíferos abiertos, y pirenomicetos parcialmente con cuerpos fructíferos cerrados.

Los Ascomycota pueden disparar las esporas en el aire con gran fuerza. A menudo esporas de muchos miles de ascosporas son liberadas simultáneamente, lo que resulta en una nube de esporas que surgen del himenio acompañado por un sonido sibilante.

2.7.3 Basidiomycetes

También conocidos como Basidiomycetos o Basidiomycota, forman el segundo grupo más grande de hongos, con más de treinta y un mil especies descritas. Boletes, agáriscos, polypores, chantarelles y puffballs son buenos ejemplos de estos (Petersen, 2013). Sus

esporas sexuales se denominan basidiosporas. Las basidiosporas son células en forma de masa con cuatro pequeñas excrecencias llamadas sterigmata. Los sterigmata producen una espора cada uno. Las esporas se descargan activamente, pero con mucha menos fuerza que en el Ascomycota. Los Basidiomycetos presentan conexiones de abrazadera en muchas especies. Las cuales, son pequeñas excrecencias en las separaciones transversales (septos) de hifas. Ayudan a los núcleos a comportarse correctamente durante las divisiones celulares.

Los basidiosporas normalmente se encuentran en himenio, donde se sitúan paralelos y entremezclados, en forma de masa llamados basidioles. El himenio generalmente se encuentra en una superficie vertical o hacia abajo para que las esporas puedan caer libremente después de la liberación.

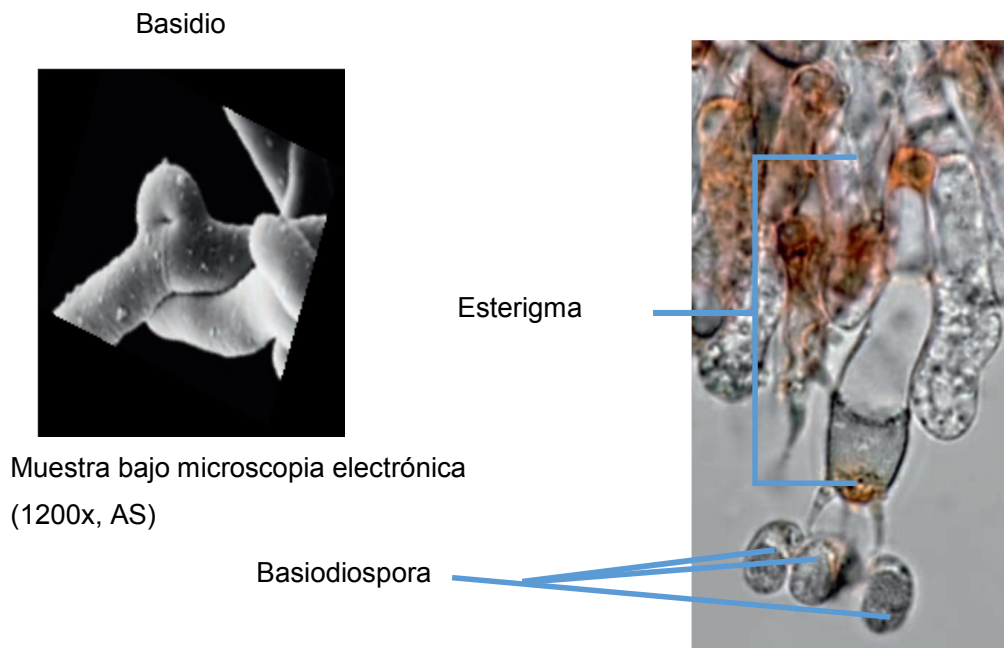


Figura 3. Espora de basidiomiceto, *Hygrocybe conica*, Denmark ($\times 2500$)

2.7.4 Microorganismos extremófilos

Los organismos extremófilos son aquellos que crecen en condiciones extremas. Estos son ambientes que se clasifican según Rothschild y Mancinelli (2001): Extremos físicos (temperatura, radiación, presión, gravedad o vacío) y extremos geoquímicos (deshidratación, salinidad, pH, especies de oxígeno o potencial redox).

También los extremófilos incluyen organismos que crecen en ambientes con extremos biológicos (ausencia de nutrientes o alta densidad poblacional). La mayoría de extremófilos son miembros de los dominios Archaea y Bacteria. También las eucariotas pueden ser extremófilos y son comunes entre los ambientes psicrófilos, acidófilos, alcalis, piezófilos, xerófilos y halófilos (que respectivamente prosperan a bajas temperaturas, bajo pH, alto pH y condiciones extremas de presión, deshidratación y salinidad) (Rothschild y Mancinelli, 2001).

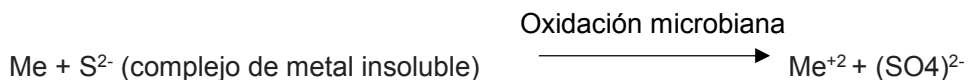
2.7.5 Levaduras acidófilas

Se definen levaduras acidófilas aquellas levaduras que viven en ambientes ácidos. Estos ambientes son de pH bajo; e incluyen suelos volcánicos, relaves ácidos de minas, suelos ácidos, vinagre, fluidos gástricos y jugos de fruta. (Madigan *et al.*, 1997). En su mayoría estos ambientes están asociados con la extracción de metales (Cavicchioli y Torsten, 2000). El agua ácida de mina es un buen ejemplo de un entorno con pH ácidos. Es un modelo interesante para obtener una mejor comprensión de la vida en mencionadas condiciones. Asimismo, nos ofrece una mejor comprensión de la supervivencia y el nicho ecológico de levaduras acidófilas en una microbiota capaz de vivir en estos ambientes extremos. Además, de la tolerancia a los metales.

La biolixiviación microbiana es el proceso de solubilizar los minerales que están en forma de sulfuros, en condiciones ácidas, los microorganismos lo solubilizan hasta sulfatos, por

la oxidación microbiana de minerales de los sulfuros, incluidos sulfuros de hierro, cobre, plomo y zinc.

Este proceso puede resumirse como:



Dónde:

Me, representa un catión metal.

Como resultado de la reacción, el pH es bajo en estos entornos, y debido a la geoquímica de los sitios de extracción, los metales catiónicos (por ejemplo, Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Al^{2+}) y elementos metaloides (por ejemplo, arsénico) se solubilizan. Este proceso se conoce como lixiviación microbiana de minerales o biolixivación (Cavicchioli y Torsten, 2000).

2.7.6 *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo de expresión de genes.

Se investigan las levaduras como organismos modelos de expresión de genes desde 1980, con la finalidad de estudiar la gran diversidad de genes y proteínas que conforman a los Eukaryas. En ese entonces, se utilizaron técnicas como clonamiento y delección de genes y producir diversas mutaciones (Winzeler *et al.*, 1999).

Scherens y Goffeau (2004), realizaron modificaciones en levaduras a nivel genómico. Cada gen fue reemplazado por un "cassete" de resistencia a antibióticos y marcados con secuencias sintetizadas en laboratorio denominado "código de barra"; este ADN exógeno tiene la facultad de silenciar ciertos genes de interés, en levaduras receptoras competitivas-transformantes. Para la selección de las levaduras mutante, se determina

por la resistencia al antibiótico empleado. Con la finalidad de obtener mutaciones puntuales y a su vez agrupar a todas las cepas mutantes en una base de ceparios “genes targets deleccionados” similar a la organización de una biblioteca.

Durante aquellos años se realizaron diversas investigaciones para un grupo limitado de genes. Dicha limitación, no permitió la investigación de nuevos genes reportados en otros organismos cercanos a *Saccharomyces cerevisiae*. No obstante, esta levadura como organismo modelo sigue contribuyendo al entendimiento de mecanismo moleculares en la biología de células eucariotas y su ontología de genes homólogos en organismos superiores.

Hoy en día, los nuevos genes se reportan en tiempo real, en la base de datos del genoma de *Saccharomyces Genome Database* (SGD; <http://www.yeastgenome.org/>) que proporciona información sobre cada gen de levadura basado no solo en la literatura, sino también en el estudio sistemático del genoma *Saccharomyces cerevisiae*. Esta base de datos se actualiza, año tras año, de acuerdo a las investigaciones realizadas por diversos científicos alrededor del mundo.

2.8 Mecanismos de resistencia en microorganismos a metales pesados

Los microorganismos poseen diversas rutas metabólicas en la cual utilizan los compuestos tóxicos como fuente de energía para su crecimiento y desarrollo. Estos compuestos tóxicos, pueden ser metales pesados. Por ello, se han desarrollado mecanismos de resistencia a metales pesados como absorción, precipitación, oxidación y reducción (Su, 2014). Además los microorganismos también han desarrollado diversos mecanismos para mantener la homeostasis y adaptarse a los metales tóxicos en el ecosistema (Figura 4) (Brar *et al.*, 2006; Hosnier *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2014). Estos mecanismos de resistencia se explotan *in situ* (tratamiento en el sitio de contaminación),

o *ex situ* (el sitio contaminado puede ser tratado lejos del punto de contaminación) para la remediación del ambiente. Estos mecanismos, se han utilizado efectivamente como biosorbentes para remoción y recuperación de metales pesados.

La mayoría de los metales pesados atraviesan las membranas microbianas, pero los microorganismos pueden desarrollar mecanismos de resistencia que los ayuden a superar el efecto tóxico. Por lo tanto, la respuesta de los microorganismos a la toxicidad de metales pesados es importante para la recuperación de sitios contaminados. Un mecanismo conocido es la desintoxicación: mecanismo de transformación de valencia. Esto es aplicable en el caso de los metales cuyos diferentes estados de valencia varían en toxicidad. Para el caso de resistencia de mercurio, la enzima alkylmercurio liasa cataliza el metil mercurio a Hg (II), que es cien veces menos tóxico (Wu *et al.*, 2010). En otro caso, los mecanismos de reducción de Cr (VI) a Cr (III) está ampliamente estudiada, en la cual el Cr (III) tiene menos movilidad y toxicidad que el Cr (VI).

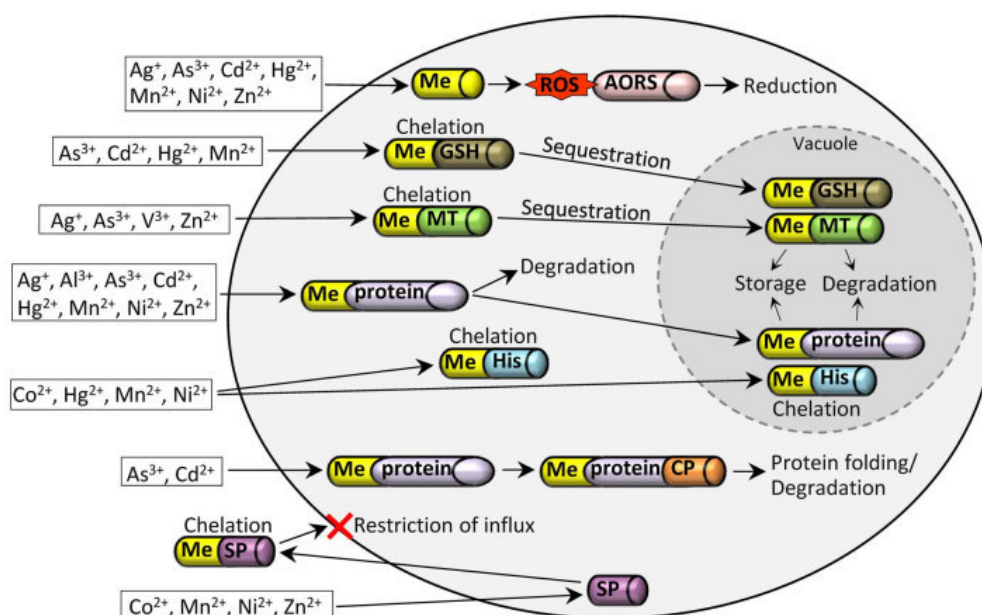


Figura 4. Modelo de mecanismos de resistencia a metales pesados en levaduras. (Hosiner *et al.*, 2014). Activación del sistema antioxidante redox (AORS) para reducir especies reactivas de oxígeno (ROS). La quelación de iones metálicos (Me) vía glutatión (GSH) y metalotioneína (MT); conlleva al secuestro vacuolar de quelatos, el almacenamiento de iones metálicos y la degradación de proteínas. En el caso de la quelación de metales sea extracelular: se realiza a través de sideróforos (SP), para restringir la entrada de metales. Asimismo, si se realiza la quelación de metales a través de histidina (His), conlleva a la degradación vacuolar y no vacuolar de complejos de metal / proteína. En el caso de unión de los iones metálicos a una proteína se activan las chaperonas (CP) para el plegamiento y degradación de complejos de metal/proteína. Para la formación del complejo metal/proteína a nivel del citosol; si hay ausencia de alguna molécula mediadora este complejo se degradara a nivel del citosol o vacuolar.

También existen otros mecanismos como biosorción, bioacumulación, biotransformación y biomineralización; entre otros (Hosiner *et al.*, 2014). Los microorganismos utilizan estos mecanismos para adaptarse y desarrollarse en un ambiente contaminado con metales. La toxicidad de los contaminantes, así como otras condiciones ambientales desfavorables, pueden contribuir a la capacidad de mantener una población microbiana competente. Estas estrategias han sido explotadas para los procedimientos de remediación (Lin *et al.*, 2005; Gadd 2000). La eliminación de metales pesados puede ser llevada a cabo por organismos vivos o materiales biológicos muertos también denominados biomasa muerta.

El organismo seleccionado debe desarrollar resistencia a los iones metálicos a medida que este en contacto con el contaminante. El organismo puede ser nativo del ambiente contaminado, o aislado de otro ambiente a fin y llevado al sitio contaminado (Sharma *et al.*, 2000). Además, hay otros mecanismos de desintoxicación de metales pesados, mediante el cual se logran a través de unión de metal/vacuola y volatilización. Para la unión de metal/vacuola intervienen los quelantes, tales como metalotioneínas, péptidos derivados de glutatión, y fitoquelatinas, péptidos de unión a metales conocidos. Estos quelantes se unen a metales pesados y facilitan la absorción microbiana y el transporte de iones de metal a vacuolas, organelas donde se inactivan la toxicidad del metal. Los mecanismos de volatilización consisten en convertir los iones metálicos en estado volátil. Esto se reporta con los metales Selenio (Se) y Mercurio (Hg), que tienen estados volátiles. Las bacterias resistentes al mercurio utilizan la enzima MerA para reducir Hg (II) a la forma volátil Hg (0) (Wu *et al.*, 2010). Otras bacterias anaerobias emplean al Selenio (V) como aceptor final de electrones reduciéndose a selenio elemental (0).

2.8.1 Biosorción

La biosorción es un proceso fisicoquímico y metabólicamente independiente basado en una variedad de mecanismos que incluyen absorción, adsorción, intercambio iónico, complejación de superficies y precipitación. La “sorción” es un proceso físico-químico mediante el cual una sustancia se pega a otro y el prefijo 'bio' denota la participación de una entidad biológica.

La biosorción es un proceso físico-químico que se puede definir como la eliminación de sustancias de solución por material biológico (Gadd, 2000). La sorción también se define para describir cualquier sistema en el que un sorbato (por ejemplo, un átomo, una molécula, un ión molecular) interactúa con un sorbente (es decir, una superficie sólida) resultando la acumulación del sorbato en el sorbente (Borda y Sparks, 2008).

2.8.2 Bioadsorción

La adsorción es la adherencia física o unión de iones y moléculas sobre la superficie de otra molécula, es decir, sobre dos superficies dimensionales. Muchos investigadores consideran la bioadsorción como una subcategoría de adsorción, donde el sorbente es una matriz biológica (Michalak *et al.*, 2013). La adsorción es un proceso físico/químico entre las cargas de las matrices, a través de la atracción electrostática de grupos funcionales cargados positivamente en la superficie de la matriz extracelular se comporta como sorbente (biosorbente) y es de carga negativa. De hecho, en los grupos funcionales de pH bajo; el biosorbente se protona y atrae el cromo de carga negativa. Por el contrario, cuando el pH es alto ocurre la desprotonación, los grupos funcionales del biosorbente se cargan negativamente, rechazando la carga negativa del cromo.

2.8.3 Bioabsorción

La absorción es la incorporación de una sustancia en un estado a otro, de un estado diferente (por ejemplo, líquidos absorbidos por un sólido o gases que se absorben por agua) (Figura 5). La biomasa microbiana tiene diferentes capacidades de bioabsorción, y varía significativamente entre especies. Sin embargo, la capacidad de bioabsorción de cada biosorbente depende de la fuente de contaminación donde fue aislada y el pretratamiento, que de ser necesario, necesita el contaminante, así como las condiciones experimentales controladas (Huangab, 2014). Para fines biotecnológicos, el bioabsorbente debe ser barato, efectivo, y fácil de cultivar y cosechar. El organismo también debería prestarse a la alteración del biorreactor configuración, así como las condiciones físicas y químicas para mejorar la biosorción.

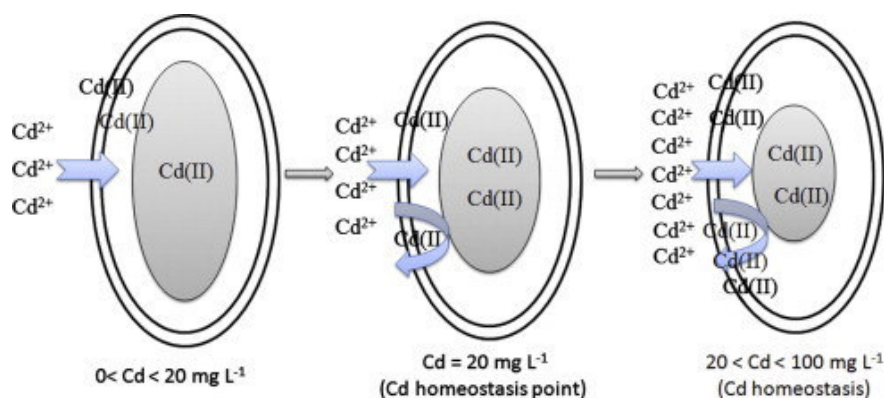


Figura 5. Homeostasis en células enfrentadas a diferentes concentraciones de cadmio (II). (Fei, 2014).

2.9 Biorremediación

La biorremediación es una técnica de última generación utilizada para la eliminación y/o recuperación de metales pesados de ambientes contaminados. La técnica utiliza, mecanismos biológicos inherentes para erradicar contaminantes peligrosos. Para la biorremediación se utilizan microorganismos y plantas, o sus metabolitos, para restaurar ambientes contaminados a su condición original (Dixit, 2015). Además no causa efectos secundarios en el ambiente impactado. Asimismo es viable y rentable para eliminación y/o recuperación de ambientes contaminados con metales.

Por otro lado, las técnicas químicas y físicas convencionales son más caras e ineficaces, especialmente para bajas concentraciones de metales (Akcil *et al.*, 2015). Asimismo, la biorremediación se emplea para aumentar la estabilidad del metal también conocida como “especiación”, y a su vez reduce la biodisponibilidad del metal (Abbas *et al.*, 2014). La especiación se define como la identificación y cuantificación de un metal y sus diferentes especies definidas, formas o fases. En cambio, la biodisponibilidad es la porción de la cantidad total de un metal en un entorno en un periodo de tiempo; en el cual, está disponible para que los organismos vivos capten el metal de su entorno. La especiación de un metal y su biodisponibilidad determina los efectos fisiológicos y tóxicos de un metal en organismos vivos (Aka y Babalola, 2016).

2.10 Generalidades toxicológicas

2.10.1 Tolerancia

Se define como aquella sustancia tóxica que llega en forma activa a su blanco. En respuesta, el organismo dificulta el flujo de aquella sustancia, la cual si llegase a su blanco causa un efecto permanente en el organismo. (Peña *et al.*, 2001). Como resultado de esto, existe un rango de valores de exposición, desde cero hasta un valor finito

determinado, en el que el organismo puede tolerar la exposición sin manifestar ningún daño. El dato importante, en este caso, es el límite superior del rango de tolerancia para poblaciones sensibles.

2.10.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria, se define como la mínima concentración de una sustancia en la cual un microorganismo no mostró crecimiento. Se clasifica de acuerdo a la turbidez (Johansson y Somasundarau, 2007). La concentración mínima inhibitoria (CMI) se expresa en partes por millón (ppm). En esta investigación la sustancia en la cual el microorganismo no mostro crecimiento fue el metal pesado. El concepto se utiliza para determinar y ajustar la concentración de metal mínima efectiva.

2.10.3 Concentración letal

Es aquella sustancia que puede ser mortal de acuerdo a la concentración que se esté aplicando. El concepto está ligado intrínsecamente con el concepto dosis. En consecuencia, la concentración letal será la que determina cual será la dosis correcta para agregar. La concentración letal tiene índices utilizados en los diversos campos de la investigación (Peña *et al.*, 2001). Desde el campo de los fármacos hasta la industria alimentaria. Los índices que se utilizan están ligados a la mortandad que causa dentro de una población. Por ejemplo, CL10, se interpreta como la concentración letal que eliminó al 10% de la población, por defecto entonces el 90% de la población no fue eliminada.

2.10.4 Dosis de exposición

La dosis de exposición está definida por la cantidad de sustancia a la que se expone el organismo y el tiempo durante el que estuvo expuesto. La dosis determina el tipo y magnitud de la respuesta biológica (Peña *et al.*, 2001). El efecto nocivo está en relación directa con la dosis y los parámetros de exposición (vía de ingreso, duración y número de exposiciones).

2.10.5 Respuesta tóxica

Se define como efecto tóxico o respuesta tóxica, cualquier desviación del funcionamiento normal del organismo que ha sido producida por la exposición a sustancia(s) tóxica(s) se considera como desviación significativa (Peña *et al.*, 2001). Se considera como desviación significativa a los cambios irreversibles o los cambios que permanecen por un período prolongado de tiempo después de la exposición a la sustancia tóxica haya cesado.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Pregunta de investigación

¿Se pueden identificar marcadores moleculares en levaduras extremófilas, aisladas de lagunas Altoandinas de la sierra central del Perú contaminadas con relaves mineros?

3.2 Hipótesis y variables de la investigación

Ha: Es posible identificar marcadores moleculares en levaduras extremófilas, aisladas de lagunas Altoandinas de la sierra central del Perú contaminadas con relaves mineros.

Ho: No es posible identificar marcadores moleculares en levaduras extremófilas, aisladas de lagunas Altoandinas de la sierra central del Perú contaminadas con relaves mineros.

Objetivos

3.2.1 Objetivo general

- Identificar marcadores moleculares en levaduras extremófilas aisladas de lagunas Altoandinas contaminadas por metales pesados de la sierra central del Perú

3.2.2 Objetivos específicos

1. Aislar, seleccionar e identificar las especies levaduras aisladas de cuerpos de agua Altoandinos contaminadas por metales pesados.
2. Determinar las fases de cinética de crecimiento de la levadura seleccionada.
3. Determinar la concentración letal media (CL50) frente a los metales pesados.
4. Crear una base de datos de genes reportados de expresión frente a metales pesados en levaduras.
5. Diseñar cebadores para genes de expresión frente a metales pesados.
6. Identificar la presencia de marcadores moleculares en levaduras extremofilas aisladas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Estaciones de muestreo

Se estudiaron 5 lagunas Altoandinas ubicadas en la cabecera de cuenca del Río Mantaro (Figura 6) y del Rímac (Figura 7). La cuenca del Río Mantaro se encuentra en el departamento de Junín, Pasco y la cuenca del Río Rímac en Lima. Ambas cuencas se encuentran ubicadas en la sierra central del Perú. Asimismo, las estaciones de las lagunas monitoreadas se Georreferenciaron en coordenadas UTM WGS84. Para ello, se utilizó el equipo GPS (GARMIN eTrex 30).

Para el área de estudio se tomaron como estaciones de toma muestras: lago Junín, relaveras; Yanamate y Quilacocha las lagunas; Milpo, Santa Catalina y Huacracocho; tal y como se muestra en las Figuras 8, 9, 10 y 11. (Mapas del Google Earth), respectivamente. Los puntos rojos representan las estaciones de muestreo. Asimismo, se georreferencio las coordenadas UTM-WGS84 véase la Tabla 2. Además, se adjunta las fotos tomadas de las estaciones durante el monitoreo véase las Figuras 30, 31, 32 y 33.

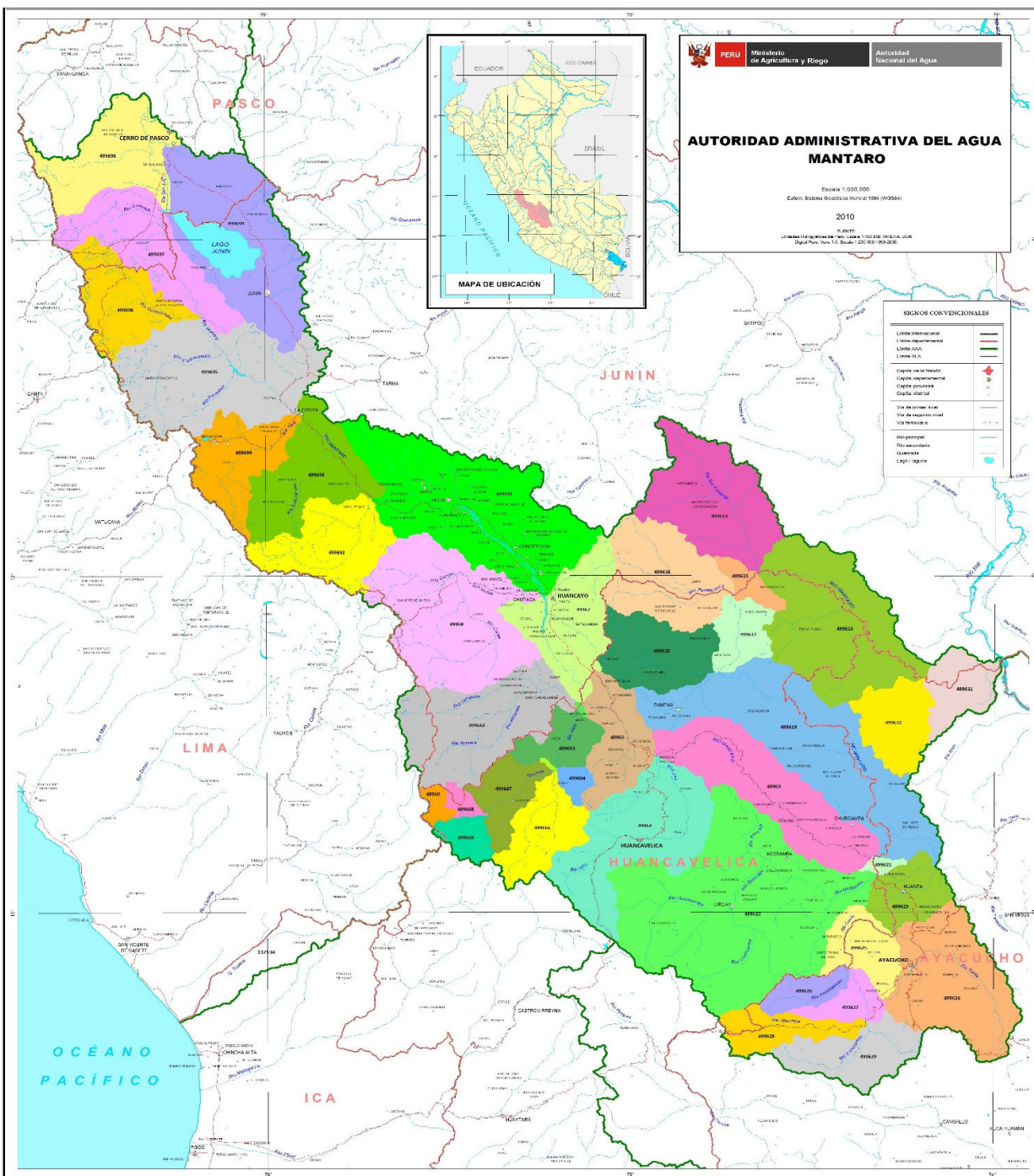


Figura 6. Cuenca del Río Mantaro. Ubicada en la sierra central. Comprende los departamentos de Pasco, Junín, Huancavelica y Ayacucho. Autoridad Nacional del Agua. Ministerio de Agricultura y Riego (2010).

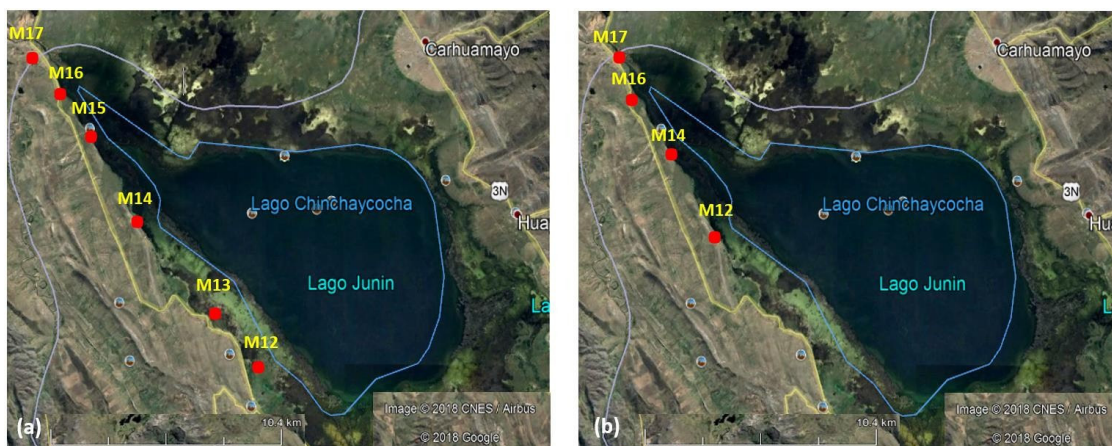


Figura 8. Estaciones de muestreo en el Lago Chinchaycocha. En los meses de junio (a) (estaciones M17, M16, M15, M14, M13 y M12) y noviembre (b) (estaciones M12, M14, M16, M17) del 2015. Región Junín, Perú.

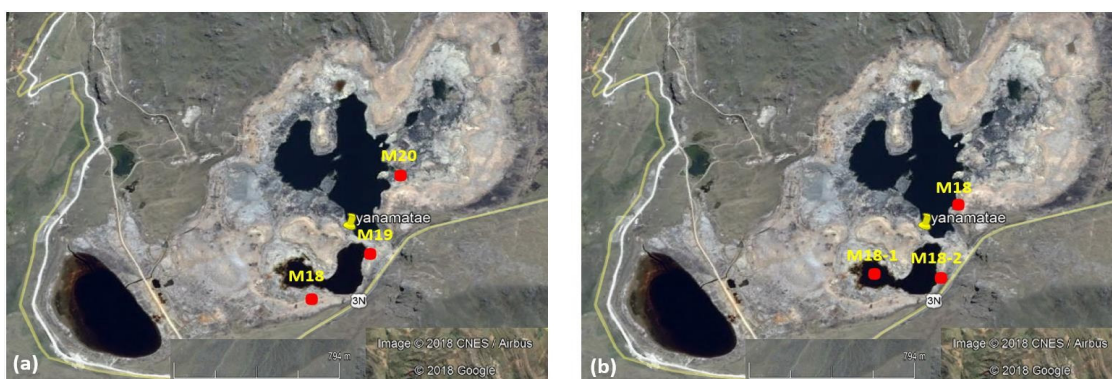


Figura 9. Estaciones de muestreo de la laguna Yanamate. En los meses de junio (a) (estaciones M18, M19 y M20) y noviembre (b) (estaciones M18-1, M18-2 y M18) del 2015. Región Cerro de Pasco, Perú.



Figura 10. Estación de muestreo de la relavera Milpo. Región Cerro de Pasco, Perú.

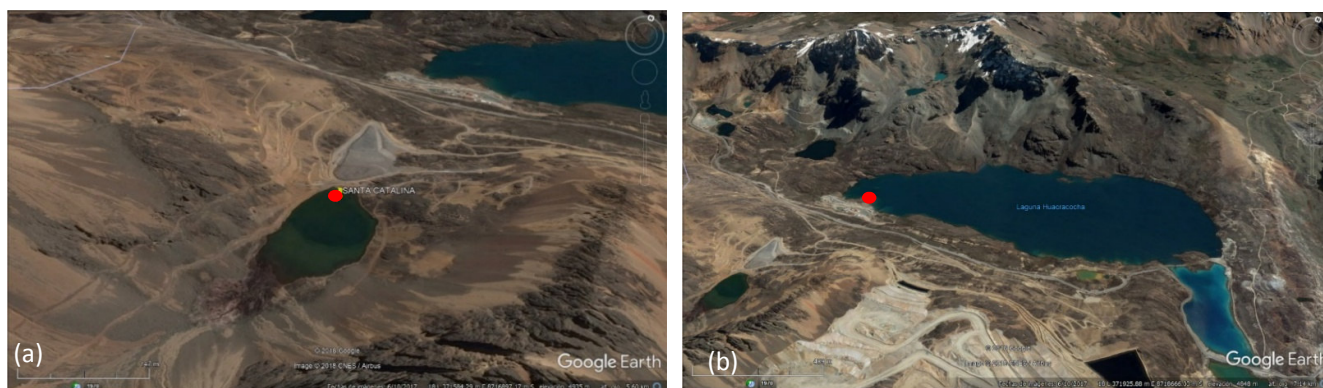


Figura. 11: Mapa de la laguna Santa Catalina (a) y Huacracocha (b). Región Junín, Perú.

Tabla 2. Georreferenciación en coordenadas UTM y altitud de las estaciones de muestreo.

ESTACIÓN	NOMBRES DE ESTACIONES*	COORDENADAS UTM 18L		Altitud (msnm)
		ESTE	SUR	
M10	Laguna Santa Catalina	371790.4300	8716628.980	4879
M11	Laguna Huacracocha	374549.8325	8718691.086	4557
M12	Lago Junín - pto 1	378916.3137	8772988.850	4088
M13	Lago Junín - pto 2	374859.5288	8778313.750	4084
M14	Lago Junín - pto 3	369824.6329	8781884.240	4084
M15	Lago Junín - pto 4	363858.8891	8790283.590	4083
M16	Lago Junín - Puente Upamayo - pto 5	362023.8370	8792482.55	4087
M17	Lago Junín - Puente Upamayo - pto 6	361978.0122	8792505.92	4087
M 12	Lago Junín	377055.703	8775862.70	4085
M 14	Lago Junín	370511.769	8782511.84	4084
M 16	Puente Junín- Puente Upamayo	361134.246	8792340.09	4088
M 17	Puente Junín- Puente Upamayo	361970.165	8792450.73	4090
M18	Relavera Yanamate – Relave – pto 1	363540.50	8814894.33	4346
M19	Relavera Yanamate – Relave – pto 2	363824.88	8815541.09	4345
M20	Relavera Yanamate - Relave - pto 3	363864.47	8815626.03	4345
M18-1	Relavera Yanamate – Relave - 1	363130.00	8814992.00	4212
M18-2	Relavera Yanamate – Relave - 2	363068.00	8815045.00	4274
M18-3	Relavera Yanamate – Relave - 3	363112.90	8814958.00	4336
M21	Laguna Milpo	367722.53	8825552.02	4002
M23	Relavera Quiulacocha – Relave	359466.68	881654.073	4257

4.2 Monitoreo de los cuerpos de agua

Se analizaron *in situ* los parámetros fisicoquímicos de cada laguna; como: temperatura (°C), pH, sólidos disueltos totales (SDT), conductividad (µS). Se siguió el protocolo Nacional Para el Monitoreo de la calidad de los Recursos Hídricos Superficiales (ANA, 2016). Para los análisis de cada estación se utilizó el equipo multiparámetro calibrado (EXTECH-DO700). Se seleccionó aquellas lagunas que presentaron parámetros no conformes con los estándares de calidad ambiental (ECA) según el Ministerio de Ambiente (MINAM, 2017) para Agua, Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM. Asimismo, las muestras de aguas seleccionadas se enviaron a los laboratorios de la Pontificia

Universidad Católica del Perú (PUCP). Laboratorios que analizaron las muestras de agua por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) para determinar los metales presentes y su concentración.

4.3 Aislamiento de levaduras extremófilas

Para el aislamiento de levaduras extremófilas, se procesaron las muestras de agua que presentaban un pH ácido. Se sembraron en caldo YPG (extracto de levadura 5 g/L, peptona 10 g/L y glucosa 30 g/L) a pH 4. Se incubaron a temperatura de 28 °C y a una agitación de 220 rpm por 14 días (Lee *et. al.*, 1975). Para obtener colonias aisladas de estos organismos, las muestras positivas se sembraron en agar YPG pH 4. Para la selección de las levaduras aisladas, se tuvo en consideración la morfología de las colonias y la morfología celular (Tinción Gram).

4.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria frente a metales pesados

Las levaduras acidófilas aisladas fueron cultivadas en tubos de ensayo con caldo YPG durante 48 horas con una agitación de 150 rpm. De cada caldo se tomó un volumen de 0.1 mL y se inoculó a tubos de ensayo que contenían 9.9 de caldo YPG más el volumen del metal para cada ensayo. Se agregó metales a concentraciones entre 50 - 400 ppm para los metales Cu, Cd, Cr y Hg. Para evaluar su resistencia, se utilizó como índice: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Aquellas levaduras que presentaron mayor resistencia fueron seleccionadas.

4.5 Determinación de la cinética de crecimiento

La levadura seleccionada, se cultivó por 72 horas con una agitación de 150 rpm a temperatura de 30°C en matraces con 250 mL de caldo YPG. Para el cultivo del inóculo se empleó la metodología propuesta por Granger *et al.*, (1992); consiste en escalamientos seriados de inóculo del 10% hasta llegar al volumen deseado. Para la cinética, se tomaron alícuotas de 1 mL por toma de muestra durante 120 horas (Ravinder *et al.*, 1993). Para determinar las unidades formadoras de colonia, cada alícuota se realizó diluciones seriadas en solución salina al 0.9% y se sembró 0.1 mL por diseminación en agar YPG a pH 4. Todas las placas fueron incubadas a 25 °C durante 72 horas. Para el recuento de levaduras, se reportó como el número de colonias presentes y se relacionó de forma directa con el tiempo para cada punto de la cinética.

4.6 Determinación de la concentración letal (CL) frente a metales pesados

Para la determinación de la concentración letal se procedió con la metodología propuesta por Jin *et al.*, (2008). La cual se aplicó para determinar el efecto letal de los metales frente a Cd, Cu y Cr en levaduras. Se cultivó la cepa en medio YPG, se incubó durante 3 h a 25°C con una agitación de 150 rpm. Este cultivo se expuso a los metales mencionados en la fase logarítmica a varias concentraciones de metal. Se determinó el número de células viables por diseminación de placa. Se sembró 0.1 mL en agar YPG y se contaron el número de células viables. Se tomó como control negativo el número de células cultivadas sólo con caldo YPG, pH 4. Para determinar el número de células viables se utilizó la siguiente formula (Baniamam, 2104):

$$\% \text{CEL. VIABLES} = \frac{\text{NTCex} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right)}{\text{NTC} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right)} \times 100\%$$

Donde:

% Cel viables: porcentaje de células viables.

NTCex: Número total de células después de una exposición algún metal.

NTC: Número total de células sin exposición algún metal.

4.7 Extracción ácidos nucleicos

Para la extracción de ácido nucleicos, se sembraron levaduras en caldo YPG y se procedió a la extracción aquella levadura que se encontraban en su fase logarítmica (Aragon *et al.*, 2006).

4.7.1 Extracción de ADN

Las cepas seleccionadas se cultivaron en caldo YPG (pH=4) por 48 horas en agitación a 150 rpm. Los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm por 8 min a temperatura ambiente. Los pellets se resuspendieron en 1 mL de buffer TE (20 mM TRIS, 5 mM EDTA, pH 7.8) y se homogenizaron los tubos por vortex. Se repitió el proceso ya descrito, hasta que el sobrenadante fuera translúcido. Alrededor de 4-5 veces.

Se procedió a la extracción de ADN de la biomasa (pellets) según el protocolo DNA extraction KiT Jet Thermo Cientific modificado en el laboratorio. La modificación consiste, en el paso final de la extracción, se resuspendió los ácidos nucleicos extraídos en etanol al 70% preparado con agua destilada libre de nucleasas. La muestra se centrifugó 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se realizó “Spin down” para no perder muestra. Se incubó las muestras a 60 °C por una hora. Las muestras se

resuspendieron 0.1 mL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.8) (Doyle, 1991). Luego se cuantificaron las muestras extraídas en NanoDrop Lite Spectrophotometer Thermo Fisher Scientific y se realizaron corridas electroforéticas en buffer TAE 1X por 30 minutos a 100 voltios para determinar la integridad del ADN. Las muestras de ADN fueron guardadas a -20 °C hasta su posterior uso.

4.7.2 Estandarización de extracción de ARN

Se expusieron cultivos de levaduras a una concentración letal media (CL50) y se realizó la extracción de ARN con el Kit Thermo Scientific GENE JET RNA Purification. Se resuspendió el cultivo de levaduras ($>10^6$ ufc/mL) en un buffer de lisis (1M Sorbitol, 0.1M EDTA pH: 7.4, 0.1% β -mercaptoetanol, 50 unidades de liticase sigma), se incubó a 25 °C por 30 minutos. Se agregó 300 μ L de buffer de Lisis suplementado con β -mercaptoetanol, mezclándose por vortex. Se agregó 2 μ L de proteinasa K se incubó por 1 hora a 10 minutos. Se centrifugó por 10 minutos por 12000 rpm, luego se transfirió el sobrenadante a un microtubo. Luego se cuantificaron las muestras extraídas en NanoDrop Lite Spectrophotometer Thermo Fisher Scientific y se realizaron corridas electroforéticas en buffer TAE 1x por 45 minutos a 100 voltios para determinar la integridad del ARN. Las muestras de ARN fueron guardadas a -20 °C hasta su posterior uso.

4.8 Búsqueda de genes

La minería de datos consiste en la búsqueda de genes reportados en levaduras que estén presentes en las diversas bases de datos disponibles en la web. En esta investigación se utilizaron la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y Saccharomyces Genome Database (SGD). En el presente trabajo se tomó como

referencia la publicación de diversos autores Kan et al. (2018), Jin et al. (2008), Orbegozo et al. (2008),

Bankar et al. (2018), Kneer et al. (1992), Singh et al. (2013) y Harrison et al. (2007).

Asimismo, también se tomó como referencia la base de datos de Saccharomyces Genome Database (SGD). Para la minería de datos se siguió el siguiente organigrama (Figura 12).

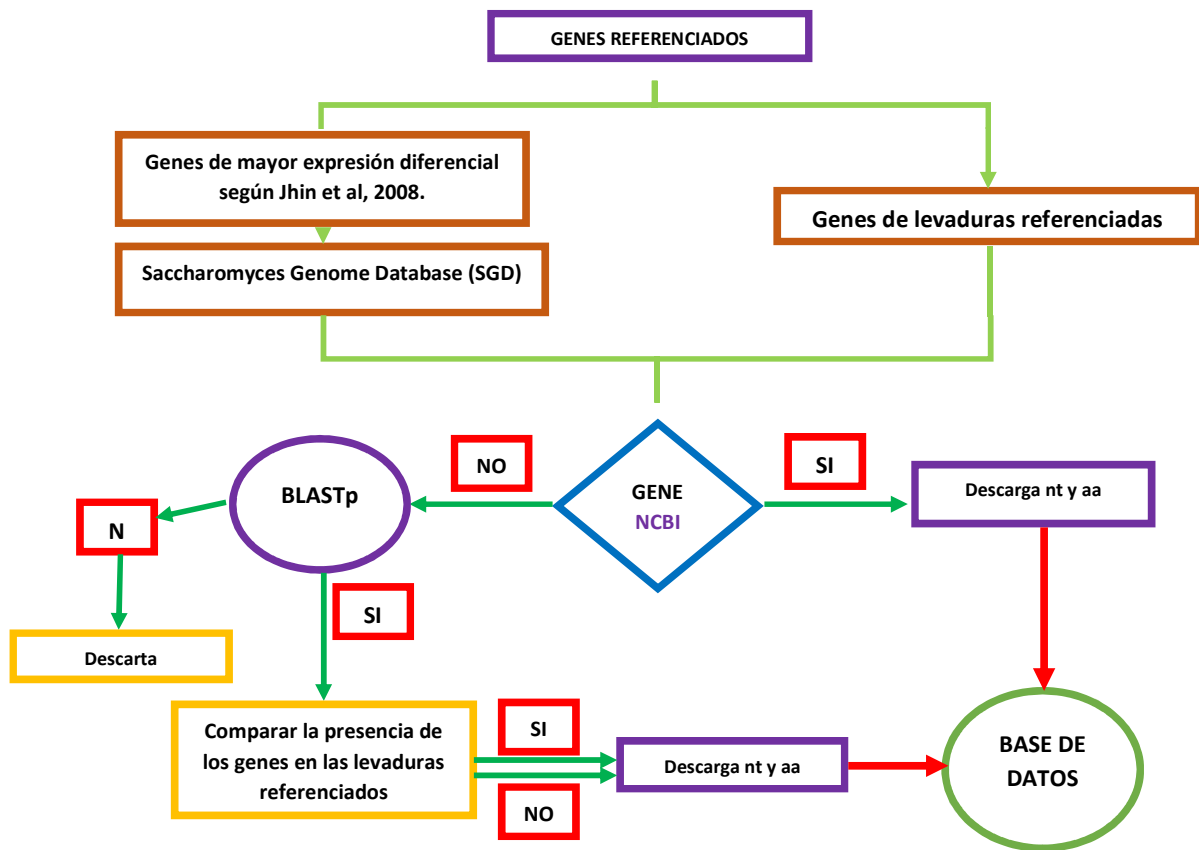


Figura 12. Flujograma de búsqueda de genes. Flujograma propuesto en el presente trabajo para la búsqueda de genes que se utilizó como base de datos. Explica paso a paso como se realizó la búsqueda de genes para la creación de una base datos. Se utilizó para el diseño de los cebadores de la presente investigación.

4.8.1 Genes de expresión diferenciada en levaduras

Para la minería de datos; se seleccionaron los genes de la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Se seleccionaron aquellos genes de expresión diferencial reportados por Jin *et al.*, (2008).

4.8.2 Levaduras reportadas en lagunas contaminadas por metales pesados o ensayos de resistencia

Se realizó un listado de especies de levaduras reportados en lagunas contaminadas por metales pesados o ensayos afines realizados.

4.8.3 Búsqueda regiones homólogas por Blastp en levaduras

Se realizó la búsqueda de regiones homólogas en el base de datos del NCBI por la herramienta “Basic local alignment search tool protein” (Blastp) para los genes de expresión diferencial.

4.8.4 Búsqueda regiones homólogas por Blastp en levaduras reportadas en lagunas contaminadas por metales pesados o ensayos de resistencia.

Se realizó la búsqueda en la base de datos del NCBI. Se utilizó la herramienta Blastp para la búsqueda de regiones homólogas y se seleccionaron aquellos genes que presentaron regiones homólogas en levaduras reportadas en lagunas contaminadas por metales pesados o ensayos de resistencia.

4.8.5 Metalotioneínas en levadura (CUP1)

Se seleccionó el gen CUP1 reportado en *Saccharomyces cerevisiae*. El gen CUP1 codifica la metalotioneína que tiene la capacidad de quelar cobre (*Katju et al.*, 2009).

4.8.6 Fitoquelatinas (PRC1), cistationina beta sintasa (CYS4) factor de transcripción - dedos de zinc (ACE2)

Se seleccionaron los genes referenciados a resistencia metales: PRC1 que codifica fitoquelatina, quelante de metales pesados (Clemens, 2006), CYS4 que codifica la enzima Cistathionine beta-sintasa. Cataliza la síntesis de cistationina a partir de serina y homocisteína y ACE2 que codifica el factor de transcripción de la metalotioneina (Butler y Thiele, 1991).

4.8.7 Control endógeno ACT1

Se seleccionó el gen ACT1, gen que codifica la β -actina presente en los microtúbulos. Se seleccionó como gen para control endógeno. Gen que no presenta cambios de expresión frente a metales pesados (Cankorur-Cetinkaya *et al.*, 2012).

4.9 Diseño de cebadores

4.9.1 Diseño de cebadores por consenso degenerado de oligo primers (CODEHOP)

Se tomó la información de los genes de la Minería de Datos. Se descargaron las secuencias aminoacídicas (aa) y nucleotídicas (nt) en formato fasta.

Se utilizó la herramienta Clustal W del Bioedit v7.0.5 para alinear las secuencias aminoacídicas e identificar las regiones consenso. Se eliminaron de los alineamientos las secuencias divergentes que no favorecieron las regiones homólogas. A partir de las regiones consenso de aminoácidos se delimitó las regiones nucleotídicas correspondientes.

Se utilizó la herramienta del Bioedit "extract position" para extraer las posiciones del alineamiento de consenso de aminoácidos.

Se utilizó la herramienta del Bioedit "extract position" para extraer las posiciones del alineamiento de nucleótidos que son equivalentes a las regiones consenso de los aminoácidos.

A partir de las secuencias nucleotídicas se identificó las posibles regiones consenso donde se diseñaron los cebadores. Para la selección de las regiones consenso se utilizaron los siguientes criterios: las regiones que presentaron mayor consenso; cercanas longitudes, menor 300 pb (Livak & Schmittgen, 2001) entre la región donde se diseñara el cebador líder (F) y reverso (R); y ambas regiones deben presentar un porcentaje de guanina-citosina (%GC) aproximado.

Una vez determinada las regiones donde se diseñaron los cebadores, se procedió al diseño del cebador líder. En el cual, la región consenso se encuentra en el extremo 5 y el núcleo degenerado en el extremo 3 de los cebadores. La característica principal de la región consenso es que debe estar constituido por el consenso de nucleótidos, esta región debe ser la más invariable posible. Por otro lado, el núcleo degenerado posee diferente tipo de combinaciones de nucleótidos que codifican para un mismo codón de aminoácido.

En el caso del cebador reverso, se repite el paso 5 pero con la única diferencia que en la región donde se diseñó el cebador reverso se construye el cebador a partir de la reversa complementaria de la región seleccionada.

Para ambos cebadores el núcleo degenerado está constituido por más de una letra y se representa de la siguiente manera: R (A o G), Y (C o T), S (G o C), W (A o T), K (G o T), M (A o C), B (C o G o T), D (A o G o T), H (A o C o T), V (A o C o G), N (cualquier base) .

4.9.2 Diseño de cebadores no degenerados

Para el diseño de cebadores no degenerados se siguió la metodología propuesta por Abd-Elsalam (2003).

4.10 Caracterización molecular de levaduras por reacción de polimerasa en cadena (PCR).

Se realizó a partir del ADN purificado, se utilizó el marcador LSU D1/D2 de la subunidad mayor ribosomal. Se preparó el master mix para un vol de 25 μ L: dNTPS 0.3 mM, $MgCl_2$ 2.5 mM, Buffer PCR 1x, cebador líder 0.3 μ M, cebador reverso 0.3 μ M, *Taq* GeNEON 0.1 μ L, el resto de volumen con agua libre de nucleasa. El programa PCR se llevó a: 5 min a 95 °C, 35 ciclos (45s a 95°C, 45s a 58°C, 45s a 72°C) y una etapa de extensión final de 5 min a 72°C. Las muestras de ADN se enviaron a secuenciar a “Molecular Cloning Laboratories” (MCLab) en EEUU, para su posterior identificación según su alineamiento BLAST () y homología con su grupo taxonómico correspondiente.

4.11 Amplificación de los cebadores diseñados por reacción de polimerasa en cadena (PCR).

Se realizó a partir del ADN purificado, se utilizó los cebadores diseñados en el paso de la metodología 4.9.1. Se preparó el master mix para un vol de 25 μ L: dNTPS 0.3 mM, $MgCl_2$ 2.0 mM, Buffer PCR fermentas con $(NH_4)_2SO_4$ 1x, cebador líder 0.3 μ M, cebador reverso 0.3 μ M, *Taq* GeNEON 0.1 μ L, el resto de volumen con agua libre de nucleasas. El programa PCR se llevó a cabo a: 5 min a 95 °C y 30 ciclos a 20s a 95°C, 20s a 60°C, 20s a 72°C y una etapa de extensión final de 5 min a 72°C. Los amplicones se enviaron a secuenciar a los laboratorios de Molecular Cloning Laboratories (MCLab). Estos laboratorios se encuentran ubicados en el estado de San Francisco, USA. Después de

su secuenciamiento, enviaron la información en formato fasta al correo institucional. Esta información se alineo software Bioedit 2.0 para los amplicones del cebador líder y reverso. Se utilizó la herramienta “ClustalW alignment” para encontrar el consenso de ambas secuencias. Se utilizó la herramienta Blastn sobre la secuencia consenso para determinar las secuencias homologas que están presentes en el GenBank. Finalmente, identificar la cepa correspondiente al marcador utilizado.

4.12 Estandarización de la síntesis de DNAc a partir del ARNm

Para cada reacción de síntesis de ADNc se utilizó First Strand cDNA PLUS Synthesis Kit, en el cual se añadió los siguientes reactivos: 1 µL de ARN (100 ng/ µL), 0.5 µL de cebadores (hexámeros aleatorios), 0.5 µL OligoT, 4 µL de 5X SCRIPT RT Buffer complete, 1 µL de 100 mM DTT, 1 µL de dNTP, 1 µL de RNasa Inhibidor, y finalmente 0.5 µL de SCRIPT REVERSE Transcriptasa. Se mezcló la reacción suavemente y se incubó a 42 °C por 10 minutos y posteriormente se incubó, a 50 °C por una hora. Luego el mix se incubó por 10 min a 70 °C para inactivar la Transcriptasa Reversa, después se agregó 2 µL de RNasa y se incubó por una hora a 37 °C. Se Enfrió en hielo durante al menos 1 min y se centrifugó a 10000 rpm x 1min. El ADNc se cuantificó por NanoDrop y se guardó a -20 °C.

5. RESULTADOS

5.1 Determinación de los parámetros fisicoquímicos de los cuerpos de agua.

Se obtuvieron los parámetros fisicoquímicos analizados de las estaciones de muestreo a partir de los cuerpos de agua (véase la Tabla 3): pH, conductividad, sólidos disueltos totales (TDS), y temperatura. Los cuerpos de agua Yanamate, Quiulacocha y Milpo presentaron parámetros fuera del límite permisible según los estándares de calidad ambiental (ECA) según el Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM. Cuerpos de agua Categoría 4. El resto de cuerpos de agua están dentro de los límites permisibles.

Los cuerpos de agua que presentaron parámetros fisicoquímicos en promedio fuera del límite permisible, según la Tabla 3, fueron: la relavera Yanamate, la laguna Quiulacocha y la laguna Milpo.

Asimismo, se determinó la concentración de metales pesados de las muestras obtenidas a partir de los cuerpos de agua (véase la Tabla 4): Aluminio, Antimonio, Arsénico, Bario, Berilio, Boro, Cadmio, Cinc, Calcio, Cobalto, Cobre, Cromo, Hierro, Magnesio, Manganeseo, Mercurio, Molibdeno, Níquel, Plomo, Selenio, Talio. Todos los cuerpos de agua presentaron parámetros fuera del límite permisible según el ECA (Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM. Cuerpos de agua Categoría 4).

Los cuerpos de agua que presentaron concentraciones de metales (mg/L) fuera del límite permisible, según la Tabla 4, fueron: laguna Yanamate, la laguna Quiulacocha, lago Junín y laguna Huacracocha.

Tabla 3: Parámetros fisicoquímicos de las estaciones muestreadas (junio-noviembre 2015).

ESTACIÓN	NOMBRES DE ESTACIONES*	pH	Conductividad	TDS	Temperatura
		Unidad pH	µS/cm	Ppt	°C
M10	Laguna Santa Catalina	4.6	8.4	0.09	0.04
M11	Laguna Huacracocha	5.18	630	0.31	12.5
M12	Lago Junín - pto 1	7.21	320	0.16	12.7
M13	Lago Junín - pto 2	7.49	1050	0.52	11
M14	Lago Junín - pto 3	7.90	430	0.21	13.5
M15	Lago Junín - pto 4	7.72	260	0.13	13
M16	Lago Junín - Puente Upamayo - pto 5	8.44	430	0.21	10.4
M17	Lago Junín - Puente Upamayo - pto 6	7.46	420	0.21	11.2
Promedio Lago Junín, junio		7.70	485	0.24	12.0
M 12	Lago Junín	7.29	200	0.08	8
M 14	Lago Junín	7.14	500	0.15	11.9
M 16	Puente Junín-Upamayo	7.24	160	0.34	11
M 17	Puente Junín-Upamayo	7.33	400	0.18	14
Promedio Lago Junín, noviembre		7.25	315	0.19	11.23
M18	Relavera Yanamate – relave – pto 1	2.58	4040.00	2.12	10.70
M19	Relavera Yanamate – relave – pto 2	2.18	12320.00	6.27	13.60
M20	Relavera Yanamate - relave - pto 3	3.32	9200.00	1.4	12.50
Promedios laguna Yanamate junio 2015		2.69	6376.67	3.26	12.27
M18-1	Relavera Yanamate – relave - 1	1.74	3999.00	2.00	10.00
M18-2	Relavera Yanamate – relave - 2	1.71	3999.00	2.00	10.50
M18-3	Relavera Yanamate – relave - 3	1.73	2173.00	1.085	11.00
Promedios laguna Yanamate noviembre 2015		1.73	3390.00	1.70	10.50
M21	Laguna Milpo	7.14	3900	0.8	14
M23	Relavera Quiulacocha – relave	2.58	9200	4.57	6.9
ECA (Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM). Cuerpos de agua Categoría 4		6,5 a 9,0	>1000	N.A.	N.A.


* Nombres corregidos por el GEOCATMIN y base de datos de Hidrología del Autoridad Nacional del Agua.


: Concentraciones de metales reportados que superan el Estándar Calidad Ambiental (ECA) según Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM

Tabla 4: Resultados del análisis de metales pesados de las muestras obtenidas de cuerpos de agua Altoandinos de la Región Cerro de Pasco.

Metales* (mg/L)	Laguna Yanamate (junio 2015)	Laguna Yanamate (noviembre 2015)	Laguna Quiulacocha (junio 2015)	Laguna Quiulacocha (noviembre 2015)	Lago Puente Upumayo (noviembre 2015)	Laguna Huacracocha (noviembre 2015)	ECA (Decreto Supremo N° 004- 2017-MINAM). Categoría 4
Aluminio	185.5	73.1	22.4	13.1	34.7	0.4735	-
Antimonio	0.409	0.319	0.068	0.053	<0.010	0.023	0.64
Arsénico	25.8	12.7	2.4	3.3	0.358	0.136	0.15
Bario	<0.0003	<0.0003	<0.0003	<0.0003	1.1225	<0.0003	0.7
Berilio	0.008	<0.003	<0.003	<0.003	<0.003	<0.003	-
Boro	9.9	4.45	9.8	4.2	0.422	0.1	-
Cadmio	1.5	0.5	0.9	0.175	0.04	N.D.	0.00025
Cinc	516	152	512	62	10.8	0.191	-
Calcio	354.7	546	269.1	178	443.3	260	-
Cobalto	0.095	0.043	0.058	0.024	0.026	<0.003	-
Cobre	52.9	26.5	4.5	3.4	2	0.137	0.1
Cromo	0.073	0.037	N.D.	0.008	0.02	N.D.	0.011
Hierro	2596.5	1044	1886.5	1045	91.9	1.434	-
Magnesio	716	104	1183	110	36	22	-
Manganeso	362.75	60.2	632	107.6	8.6	0.9925	-
Mercurio	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	0.0001
Molibdeno	<0.004	<0.004	<0.004	<0.004	<0.004	0.009	-
Níquel	0.188	0.073	0.122	0.042	0.04	N.D.	0.052
Plomo	0.135	0.217	0.098	0.174	2.3	0.101	0.0025
Selenio	<0.010	<0.010	0.047	<0.010	<0.010	<0.010	0.005
Talio	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	0.0008

*Método: Inductively Coupled Plasma (ICP) o Espectrómetro de Plasma Inducido-Muestras analizadas en el Instituto de Corrosión de la PUCP.

 : Concentraciones de metales reportados como Estándar Calidad Ambiental (ECA)-Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM

 : Concentraciones de metales que superan ECA Nacionales por ICP-MS.

5.2 Aislamiento de levaduras extremófilas

Se aislaron 12 levaduras en medio YPG a pH 4.5 con diversas características morfológicas (Figura 13, 14, 15, 16, 17 y 18). Se presentaron 3 grupos predominantes según su comportamiento cultural (Tabla 5): El primer grupo son levaduras rosáceas y opacas, el segundo son levaduras blancas y mucosas, el tercero son levaduras secas de borde irregular. Las cepas 2LJJ1, 2RMP3, 2RHP5, pertenecen al primer grupo; las cepas 2LQCP4, 2RYP9, 2RMP1 al segundo y las cepas 4LYP0, 2LJJ6, 2LHJ2 al tercero.

Tabla 5: Levaduras aisladas de los cuerpos de aguas contaminadas por metales.

CEPA	LUGAR DE AISLAMIENTO	COMPORTAMIENTO CULTURAL
2LJJ1	Lago Junín, Junín.	Rosácea, bordes definidos, mucoides, grandes, opacas.
2LQCP4	Relavera Quiulacocha, Cerro de Pasco.	Secas, brillantes, color blanco, borde definido, opaca.
2RMP2	Relavera Milpo, Cerro de Pasco.	Rosácea, bordes definidos, mucoides, pequeñas, translucidas.
4LYP0	Relavera Yanamate, Cerro de Pasco.	Mucoides, brillantes, color blanco, bordes definidos.
2LJJ6	Lago Junín, Junín.	Mucoides, brillantes, color blanco crema, borde definido.
2RHP5	Relave Huarón, Pasco.	Rosácea, borde definido, mucoides, cremosa,
2RYP9	Relavera Yanamate, Cerro de Pasco.	Secas, borde irregular, blancas, perladas, opacas.
2LHJ2	Laguna Huacracocha, Junín.	Mucoides, brillantes, color blanco, borde definido, opaca.
2RYP2	Relavera Yanamate, Cerro de Pasco.	Secas, brillantes, color blanco, borde definido.
2LJJ2	Lago Junín, Junín.	Rosácea, borde definido, mucoides, cremosa,

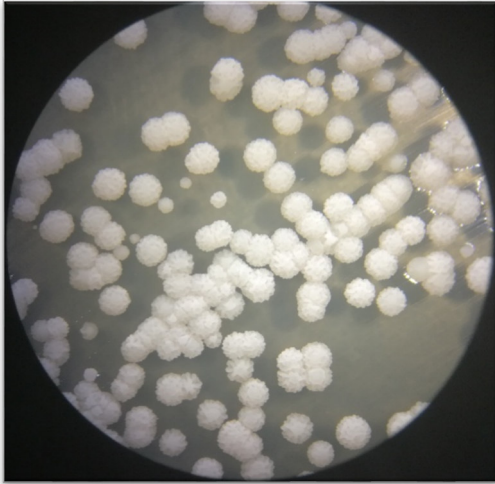


Figura 13. Ceba 2LQCP4.
Rhodotorula mucilaginosa

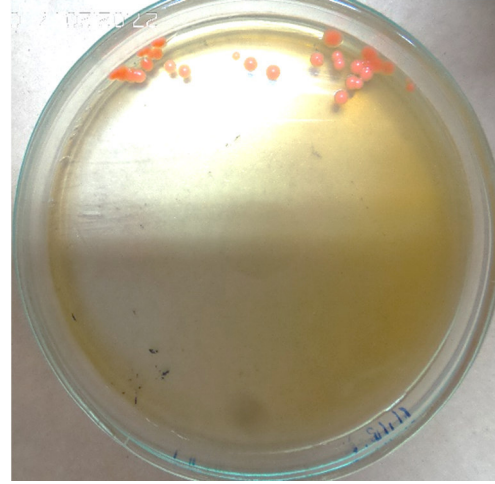


Figura 14. Ceba 2RYP9.
Rhodotorula toruloides

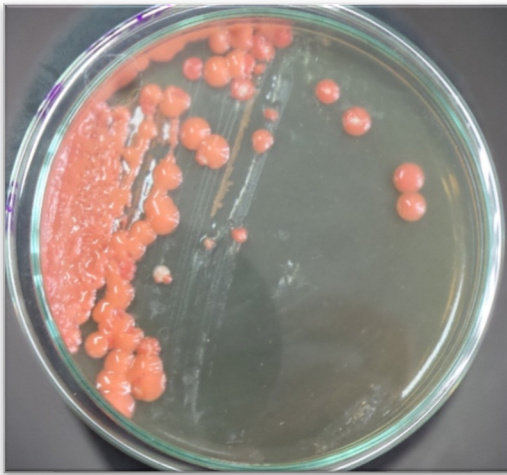


Figura 15. Ceba 2RMP3.
Rhodotorula mucilaginosa



Figura 16. Ceba 4LYP0.
Meyerozyma guilliermondii

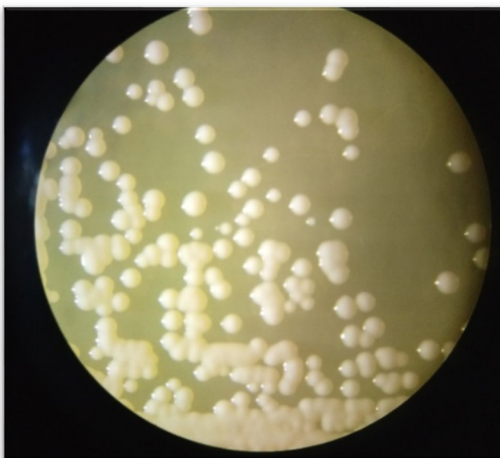


Figura 17. Ceba 2LHJ2.
Meyerozyma guilliermondii

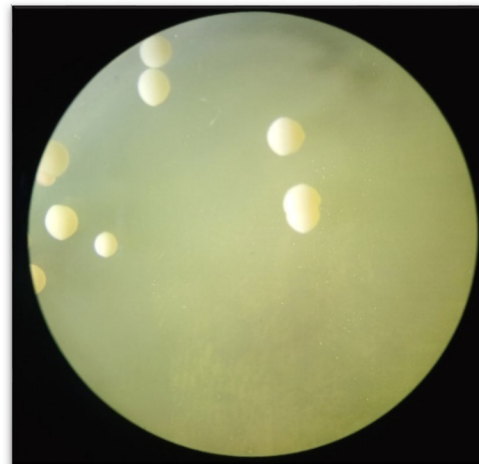


Figura 18. Ceba 2LJJ6
Yarrowia lipolytica

5.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a metales pesados.

La siguiente (Figura 19) presenta la concentración mínima inhibitoria de las levaduras aisladas. Se utilizaron los datos del anexo (Tabla 12) para determinar la CMI para las levaduras: 2LQCP4, 2RMP3, 4LYPO, 2LJJ6, 2RHP5, 2RYP9, 2LHJ2, 2RYP4, 2LJJ2, 2LJJ1 y SC.

Según el ensayo CMI frente a metales pesado, la cepa 2LJJ1 presentó mayor resistencia para todos los metales enfrentados. Se seleccionó la cepa 2LJJ1 para las siguientes pruebas.

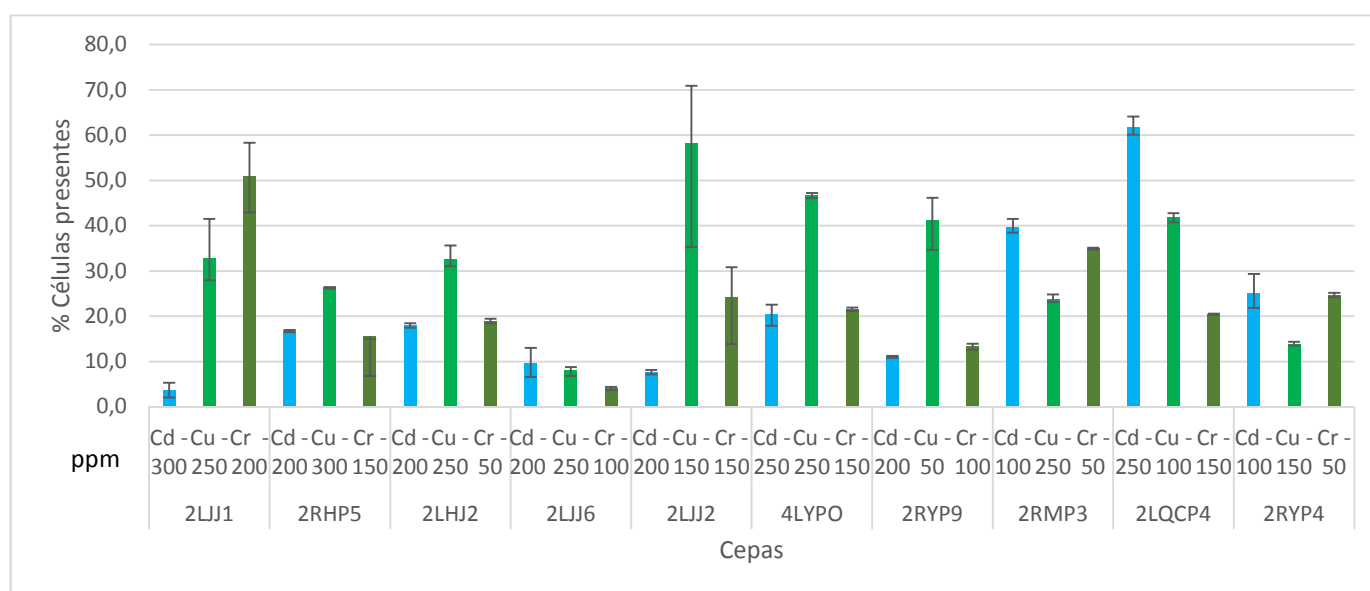


Figura 19. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se observó que la mayoría de las levaduras superaban concentraciones mayores de 50 mg/L. Las levaduras toleraron concentraciones mayores de cadmio (100 mg/L), seguidas por cobre (100 ppm) y en último lugar el cromo (50 mg/L).

5.4 Determinación de la cinética de crecimiento

Se determinó la cinética de crecimiento de la cepa 2LJJ1 (Figura 20) en medio YPG a pH 4.5. En el Anexo, en la Tabla 19; se encuentran todos los datos de la Figura 20. Se determinó las fases de crecimiento de la levadura: fase de adaptación 0-48 horas, fase exponencial 53-88 horas, fase estacionaria 88-96 horas y la fase de muerte 96-121 horas. Se determinó dentro de la fase exponencial (Figura 21) que la tasa de crecimiento de la levadura (μ) fue 0.0181 h^{-1} .

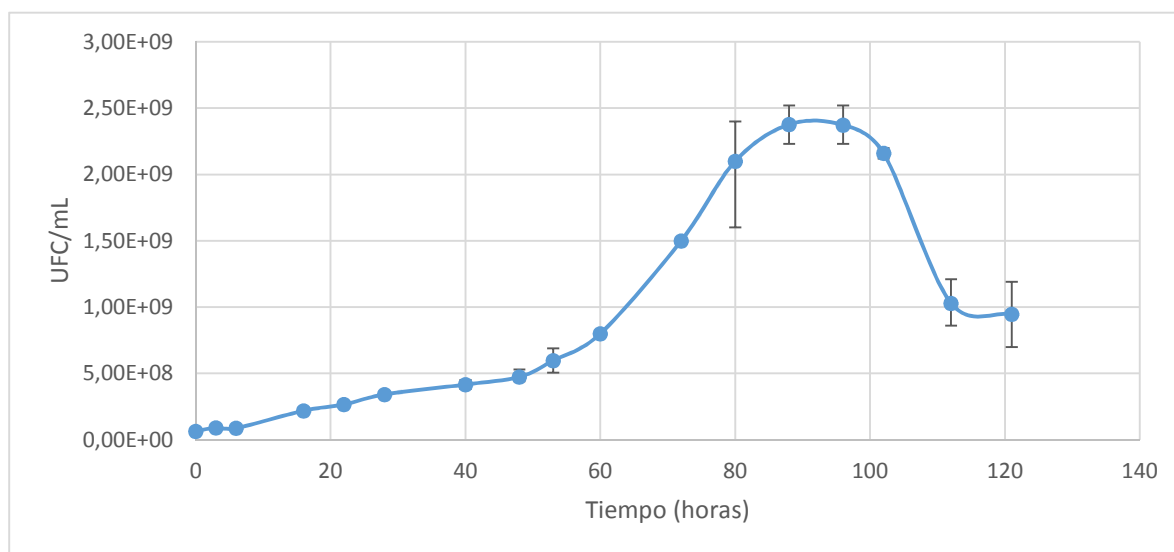


Figura. 20: Cinética de crecimiento de la cepa 2LJJ1 durante 120 horas. Se observa un crecimiento logarítmico con una pendiente positiva pronunciada. La fase estacionaria es mínima y en su final se observa la fase de muerte con una pendiente negativa pronunciada.

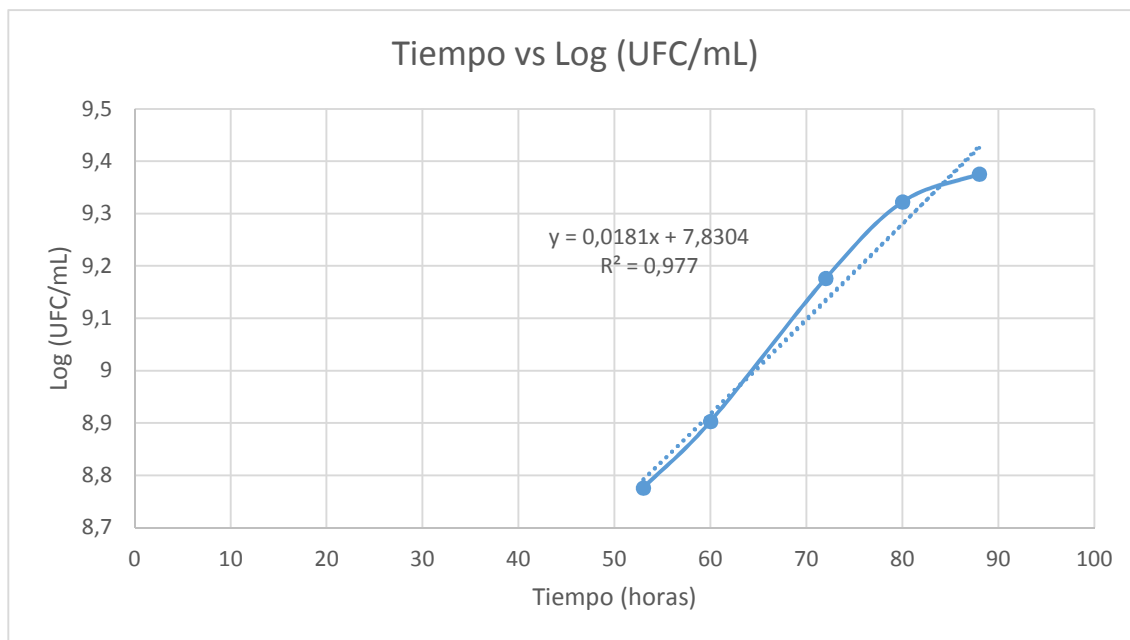


Figura. 21: Cinética de crecimiento fase exponencial. Tiempo (h) vs Log (UFC/mL).

Se determinó la ecuación de la recta de la fase exponencial. A partir de la ecuación de la recta se determinó $\mu = 0.0181 \text{ hrs}^{-1}$.

5.5 Determinación de la concentración letal media (CL₅₀) frente a metales pesados

La concentración letal de la cepa 2LJJ1 para los metales fue la siguiente: cromo (Cr) 60-40 ppm letal para el 50% de la población; cobre (Cu) 60 ppm letal para el 30% de la población; cobre (Cu) 80 ppm letal para el 47% de la población; cadmio (Cd) 40 ppm letal para el 3% de la población; cadmio (Cd) 60 ppm para el 41% de la población ; cadmio (Cd) 65 ppm para el 50% de la población; cadmio (Cd) 70 ppm para el 75% de la población; mercurio (Hg) 5 ppm para el 12% de la población y finalmente, para mercurio (Hg) 10 ppm el 46% de la población (Figura 22). Los datos del anexo (Tabla 20) se utilizaron para determinar la concentración letal media CL₅₀ para cada metal.

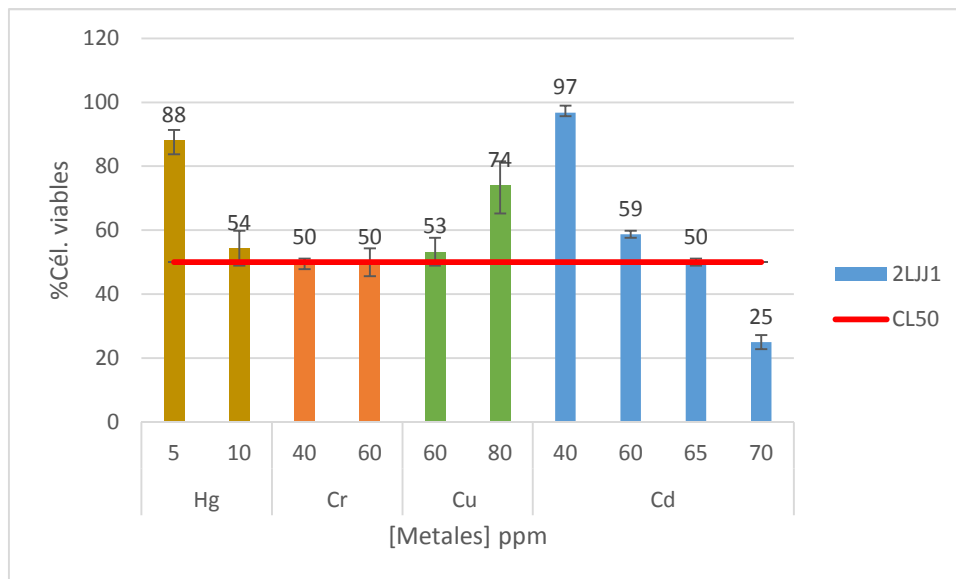


Figura. 22: Porcentaje de células viables vs concentración metal (ppm). Se determinó la concentración letal que tiene actividad citotóxica sobre el 50% de la población de levaduras. Para los metales cromo (Cr) 40-60 ppm; cobre (Cu) 80 ppm; cadmio (Cd) 65 ppm; mercurio (Hg) 10 ppm.

5.6 Extracción de ácidos nucleicos

5.6.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se determinó la concentración de ácidos nucleicos y la pureza (ABS 260/280) en el Nanodrop a partir de las levaduras aisladas (Tabla 6). La corrida electroforética de los ADN se observa en la Figura 23.

Tabla 6: Determinación de la concentración de ácidos nucleicos y absorbancia a partir de la extracción de ADN. Las absorbancias a 260/280 nm son mayores 2. Indica la presencia de residuos de ARN en nuestra extracción de ADN.

N°	CEPA	Concentración de ácidos nucleicos ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	ABS. 260/280
1	2LQCP4	50	2.11
2	2RMP3	70	2.23
3	4LYP0	300	2.12
4	2LJJ6	330	2.11
5	2RHP5	150	2.18
6	2RYP9	50	2.10
7	2LHJ2	200	2.18
8	2RYP4	30	1.98
9	2LJJ2	400	2.17
10	2LJJ1	450	2.21
11	SC	250	2.12

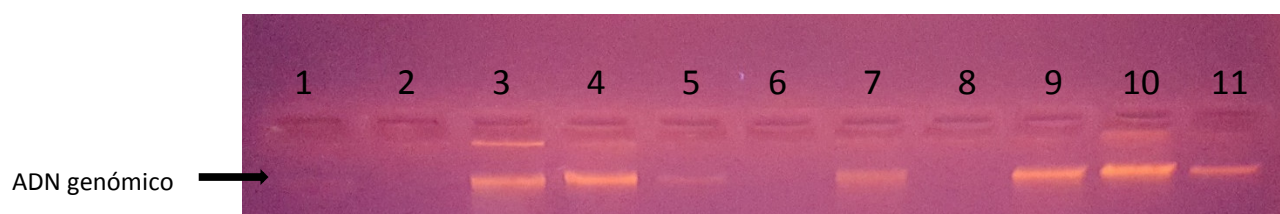


Figura 23. Electroforesis de la extracción de ADN. Agarosa al 1.5% TAE 1x 100v x 30 minutos. Los ácidos nucleicos se encuentran enumerados en los carriles del 1 al 11 (1) 2LQCP4 (2) 2RMP3 (3) 4LYP0 (4) 2LJJ6 (5) 2RHP5 (6) 2RYP9 (7) 2LHJ2 (8) 2RYP4 (9) 2LJJ2 (10) 2LJJ1 (11) SC. Se observa bandas definidas de ADN genómico. Estas bandas fueron de alta y baja intensidad.

5.6.2 Estandarización de la extracción de ARN

Se extrajo ARN de la cepa 2LJJ1 a las 78 horas de cultivo en 3 condiciones: (Tabla 7). En la 1era condición, en ausencia de estrés por metal, la concentración de ácidos nucleicos sin tratamiento con DNAsas fue 270 ng/μL y con tratamiento 180 ng/μL. En la 2da condición, en presencia de la CL50 del metal Cu, la concentración de ácidos nucleicos sin tratamiento con DNAsas fue 90 ng/μL y con tratamiento 60 ng/μL. En la 3era condición, en presencia de la CL50 del metal Cd, la concentración de ácidos nucleicos sin tratamiento con DNAsas fue 120 ng/μL y con tratamiento 80 ng/μL.

Asimismo, también se extrajo ARN de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* (SC) en ausencia de estrés por metal. Se obtuvo que la concentración de ácidos nucleicos sin tratamiento con DNAsas fue 50 ng/μL y con tratamiento 30 ng/μL. La corrida electroforética de las muestras de ARN se puede observar en la Figura 24.

Tabla 7: Determinación de la concentración de ácidos nucleicos (ARN). ARN antes del tratamiento y después del tratamiento con DNAsas.

CEPA	CONDICIÓN	Concentración de ácidos nucleicos antes del tratamiento con DNAsas (ng/μL)	Concentración de ácidos de nucleicos después del tratamiento con DNAsas (ng/ μL)	ABS. 260/280
2LJJ1	Sin exposición al metal	270	180	2.01
2LJJ1	CL50 del Cu	90	60	2.03
2LJJ1	CL50 del Cd	120	80	2.01
SC	Sin exposición al metal	50	30	2.04

Se observa la actividad de la DNAsas sobre los ácidos nucleicos, hay disminución de la concentración de los ácidos nucleicos en todos los tratamientos enzimáticos.

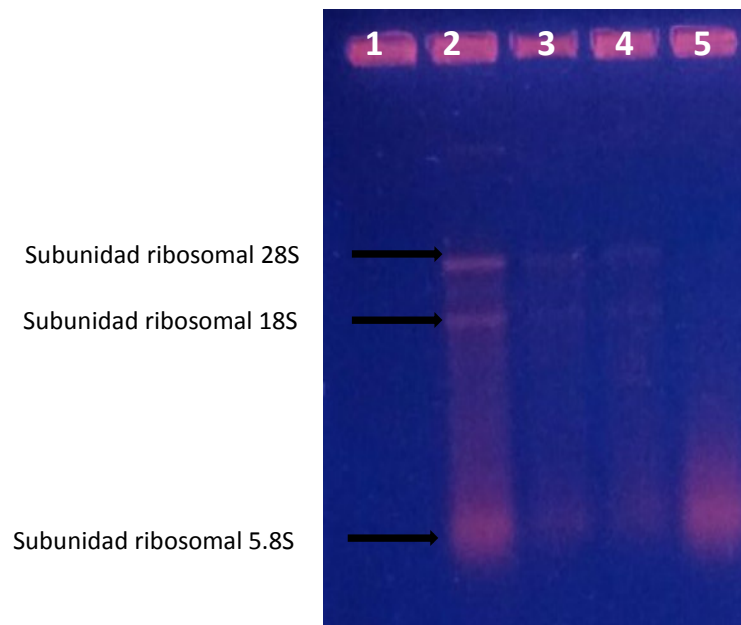


Figura 24: Electroforesis de la extracción de ARN en condiciones de CL50 frente a metales pesados. Agarosa al 2.5% TAE 1, a 100v x 80 minutos. Los ácidos nucleicos se encuentran enumerados en los carriles del 2 al 5 (2) 2LJJ1 sin metales (3) 2LJJ1 CL50 Cu (4) 2LJJ1 CL50 Cd (5) SC sin metales. Se observan 3 bandas definidas: ARNr 28s, ARNr 16S, ARNr 5.8S.

5.7 Búsqueda de genes

5.7.1 Genes de expresión diferenciada en levaduras

Para la minería de datos; se seleccionaron los genes de la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Se seleccionaron aquellos genes de expresión diferencial reportados por Jin *et al.* (2008). La información se encuentra en una tabla en formato excel con el siguiente código doi: 10.1371/journal.pgen.1000053.s003. Para la selección de aquellos genes se tomaron 2 criterios: el primero, que los genes presentaron un "fold change" mayor a 2.5 (Tabla 8) y menor a 2.5 (Tabla 9). El segundo, la exposición a los metales seleccionados; para los ensayos de la presente investigación los metales seleccionados fueron los siguientes: Cadmio (Cd), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Mercurio (Hg).

Tabla 8. Genes seleccionados para el diseño de cebadores como potenciales marcadores Genes de expresión diferencial mayor a 2.5 en cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), mercurio (Hg).

Genes de expresión diferencial mayor a 2.5					
N°	GEN	N°	GEN	N°	GEN
1	TPO2	9	COB	17	YOX1
2	YDR222W	10	LSM9	18	ARX1
3	AQR1	11	RPS8A	19	GOT1
4	HCS26	12	RSA4	20	FTR1
5	YRO2	13	PTR2	21	SMF3
6	AI1	14	NOG2	22	MET14
7	FET3	15	SRP40	23	MET3
8	ENA1	16	MIG2	24	ATM1

Tabla 9. Genes seleccionados para el diseño de cebadores como potenciales marcadores Genes de expresión diferencial menor a -2.5 en cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), mercurio (Hg).

Genes de expresión diferencial menor a -2.5					
N°	GEN	N°	GEN	N°	GEN
1	YHR209W	12	YMR206W	23	IDP3
2	STF2	13	YER121W	24	YNL194C
3	CAT8	14	HXT7	25	ARO10
4	CTR1	15	GPH1	26	GLP1
5	ARG1	16	YNR073C	27	MAL32
6	COX5B	17	CWP1	28	HXT6
7	HXK1	18	YBR033W	29	YER067W
8	PEX18	19	EMI2	30	MAL12
9	YLR331C	20	OPI3	31	YLR327C
10	YBR139W	21	GCV1		
11	SHM2	22	YLR271W		

El número de genes de expresión diferencial mayor a 2.5 fue 24 y menor a -2.5 fue 32. Aquellos genes fueron comparados en la base de datos Saccharomyces Genome Database (SGD) y en la base de datos del National Center Biotechnology Institute (NCBI), en la sección gene. En la base de datos SGD se encontró todos los

reportes para cada gen en *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, en la base de datos del NCBI; no se encontraron los siguientes genes reportados para expresión diferencial mayor a 2.5: YDR222W, y para expresión diferencial menor a -2.5: YLR331C, YMR206W, YER121W, YNR073C, YBR033W, YLR271W, MAL32 y YLR327C. El número de genes expresión diferencial se redujeron. Para los genes de expresión diferencial mayor a 2.5 fue 23 y para los menor a 2.5 fue 24.

5.7.2 Levaduras reportadas en lagunas contaminadas por metales pesados o ensayos de resistencia

Se realizó un listado de especies de levaduras reportados en lagunas contaminadas por metales pesados o ensayos afines realizados (Tabla 10).

Tabla 10. Levaduras reportadas en lagunas contaminadas o ensayos de resistencia y sus referencias bibliográficas respectivas.

N°	LEVADURA	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA
1	<i>Rhodosporodidium mucilaginosa</i>	Kan <i>et al.</i> , 2018
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Jin <i>et al.</i> , 2008
3	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Orbegozo <i>et al.</i> , 2008
4	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Bankar <i>et al.</i> , 2018
5	<i>Neurospora crassa</i>	Kneer <i>et al.</i> , 1992
6	<i>Cryptococcus sp</i>	Singh <i>et al.</i> , 2013
7	<i>Candida sp</i>	Harrison <i>et al.</i> , 2007

5.7.3 Búsqueda regiones homólogas por Blastp en levaduras

Se realizó la búsqueda de regiones homólogas en el base de datos del NCBI por la herramienta Basic local alignment search tool protein (Blastp) para los genes de expresión diferencial. No se encontraron regiones homólogas para los siguientes genes de expresión diferencial mayor a 2.5: SRP40, MIG2, ARX1, PTR2, TP02,

HCS26. Asimismo, los genes de expresión diferencial menor a 2.5: CAT8, CTR1, ARG1, PEX18, SHM2, HXT7, CWP1, OP13, GCV1, IDP3, ARO10 y GLP1. Se redujo el número de genes de expresión diferencial, para los genes mayores a 2.5 fue 17 y para los menores a 2.5 fue 12.

5.7.4 Búsqueda regiones homólogas por Blastp en levaduras reportadas en lagunas contaminadas por metales pesados o ensayos de resistencia.

Se realizó la búsqueda en la base de datos del NCBI. Se utilizó la herramienta Blastp para la búsqueda de regiones homólogas y se seleccionaron aquellos genes que presentaron regiones homólogas en levaduras reportadas en lagunas contaminadas por metales pesados o ensayos de resistencia. En la Tabla 11, se reportan la evaluación de las regiones homólogas entre los genes de expresión diferencial mayor a 2.5 reportada de la Tabla 8 y las especies de levaduras reportadas de la Tabla 10. En la Tabla 12 se evaluó las regiones homólogas entre los genes de expresión diferencial menor a 2.5 reportada de la Tabla 9 y las especies de levaduras reportadas de la Tabla 10.

Tabla 11. Genes de expresión diferencial mayor a 2.5 y especies reportadas.

	AQR1	YRO2	AI1	COB	LSM9	RPS8A	RSA4	NOG2	YOX1	GOT1	FTR1	SMF3	MET14	MET3	FET3	ENA1	ATM1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	X	X	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Rhodospiridium mucilaginosa</i>	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	X	X
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	X	X
<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
<i>Neurospora crassa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	X	-	-	-
<i>Candida sp</i>	X	X	-	-	-	-	-	X	X	-	X	X	X	X	X	-	X

X : Presencia de regiones homólogas entre los genes de expresión diferencial mayor a 2.5 y levaduras reportadas.
 - : Ausencia de regiones homólogas entre los genes de expresión diferencial mayor a 2.5 y levaduras reportadas.

Tabla 12. Genes de expresión diferencial menor a 2.5 y especies reportadas

	YHR209W	STF2	COX5B	HXK1	GPH1	EMI2	YNL194C	HXT6	MAL12	ZRT1	YER067W	YBR139W
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	X	X	-	-	X	X	X	-	-
<i>Rhodospiridium mucilaginosa</i>	-	-	-	X	-	-	-	X	X	-	-	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Neurospora crassa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida sp</i>	-	-	-	X	X	-	-	X	-	X	-	-

X : Presencia de regiones homólogas entre los genes de expresión diferencial mayor a 2.5 y levaduras reportadas.

- : Ausencia de regiones homólogas entre los genes de expresión diferencial mayor a 2.5 y levaduras reportadas.

A partir de la evaluación entre genes de expresión diferencial y especies de levaduras reportadas; se seleccionaron 12 genes de expresión diferencial mayor a 2.5: AQR1, YRO2, NOG2, YOX1, GOT1, FTR1, SMF3, MET14, MET3, FET3, ENA1, ATM1; y 5 genes de expresión diferencial menor a 2.5: HXK1, GPH, HXT6, MAL12, ZRT1. Estos 17 genes en total se utilizaron para diseñar los cebadores de genes de resistencia a metales pesados (Tabla 21).

5.7.5 Metalotioneínas en levadura CUP1

Se seleccionó el gen CUP1 reportado en *Saccharomyces cerevisiae*. El gen CUP1 codifica la metalotioneína que tiene la capacidad de quelar cobre (Katju *et al.*, 2009). En su trabajo reporta los siguientes cebadores: F: GCCAATGTGGTAGCTGCAAA y R: TCAGACTTGTTACCGCAGGG. Los cebadores amplifican una región de 103 nt en *Saccharomyces cerevisiae*.

5.7.6 Fitoquelatinas (PRC1), cistationina beta sintasa (CYS4) factor de transcripción - dedos de zinc (ACE2)

Se seleccionaron los genes referenciados a resistencia metales: PRC1 que codifica fitoquelatina, quelante de metales pesados (Clemens, 2006), CYS4 que codifica la enzima cistationina beta sintetasa. Cataliza la síntesis de cistationina a partir de serina y homocisteína y ACE2 que codifica el factor de transcripción de la metalotioneína (Butler y Thiele, 1991).

5.7.7 Control endógeno ACT1

Se seleccionó el gen ACT1, gen que codifica la β -actina presente en los microtúbulos. Se seleccionó como gen para control endógeno. Gen que no presenta cambios de expresión frente a metales pesados (Cankorur-Cetinkaya *et al.*, 2012).

La descripción de los genes seleccionados se encuentra en la sección Anexo - Tabla 24.

5.8 Diseño de cebadores

5.8.1 Diseño de cebadores por consenso degenerado de oligo primers (CODEHOP)

Se buscaron los genes homólogos en otras especies de levaduras. Se utilizaron los genes de las Tablas 11, y 12. Asimismo se utilizaron los genes reportados en la sección 5.7.6. Se descargaron las secuencias de la base de datos del NCB en formato fasta (Tabla 22). En el caso de las secuencias nucleotídicas, solo se descargaron las secuencias codificantes (cds). Para el diseño de cebadores por consenso degenerado de híbridos oligo primer (CODEHOP) se siguió la metodología propuesta en la presente investigación. Para graficar el procedimiento del diseño del cebador degenerado se utilizó como modelo el gen ATM1 (Figura 36 y Figura 37):

Como resultado se obtuvieron los cebadores de los siguientes genes: ATM1, GPH1, CYS4, ENA1, PCS, ACE. (Tabla 13)

Tabla 13: Cebadores degenerado diseñados a partir de los genes seleccionados como potenciales marcadores de expresión frente a metales pesados. Se diseñaron con un tamaño menor 300 pb. El número máximo de combinaciones para los cebadores degenerados fue 16.

N°	Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño del amplicon	N° combinaciones*
1	Seq1_F_ATM1	GAT CGA GGA ACN AAR GGY AT	53.1	121	16
2	Seq2_R_ATM1	TA GGT CAA AAT BCC RCA RAC	52.1		12
3	Seq5_F_GPH1	G CAG ATC ATC TAY GAY ATC AA	49.6	168	4
4	Seq6_R_GPH1	T AGC AAC ACC RTT RAC CTT GTG	55.5		4
5	Seq7_F_CYS4	GGT AAC ACC GGT ATH GG	50.2	150	3
6	Seq8_R_CYS4	CCA AGC AGC TTC RGT NGG RGT	61		16
7	Seq9_F_ENA1	GGT GCC CTA TCN ATG ATY CC	55.1	154	4
8	Seq10_R_ENA1	AG CTT GTC RGA RCA RAT	49.6		8
9	Seq11_F_PRC1	AAC ATG CTC GAY TGY TGY	52.8	297	8
10	Seq12_R_PRC1	CTT GAA TCK VGC RAC GTC	52.8		12
11	Seq13_F_ACE2	GG TCG CAT ATT CAR ACM CAT	52.8	245	8
12	Seq14_R_ACE2	AG ATC GTG CTG TCG WAC AAA	54.3		2

N° combinaciones*: Se obtiene por la permutación de las posibles bases que conforman un codón para un mismo aminoácido dentro del cebador diseñado.

5.8.2 Diseño de cebadores no degenerados

Para el diseño de cebadores no degenerados se siguió la metodología propuesta por Abd-Elsalam (2003). En nuestra investigación la metodología se aplica para el diseño de cebadores del gen ACT1. Gen que codifica microtúbulos beta actina. Asimismo, para el gen CUP1, gen que codifica la metalotioneína. Proteína capaz de quelar el cobre. Tabla 14

Tabla 14: Cebadores no degenerados diseñados a partir de los genes Cup1 y Act como potenciales marcadores. Se diseñaron con un tamaño menor 300 pb.

N°	Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño del amplicon
1	Cup1 F	GCCAATGTGGTAGCTGCAAA	56.4	103
2	Cup1 R	TCAGACTTGTTACCGCAGGG	57	
3	Act_F	GTATCATGGTCGGTATGGG	52.2	146
4	Act_R	GAAAGTGTGGTGCCAG	50.6	

Asimismo, se determinó los parámetros físico químicos para las estructuras secundarias de los cebadores (véase la Tabla 23).

5.9 Caracterización molecular de levaduras por reacción en cadena de polimerasa (PCR)

A partir del secuenciamiento de la región LSU D1/D2 de la subunidad mayor se obtuvieron entre 600 y 700 pares de bases (pb) (Figura 26). Se identificaron los géneros: *Rhodotorula*, *Meyerozyma*, *Yarrowia*. Dentro del género *Rhodotorula* se identificaron *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula toluroides*. Para el género *Yarrowia* se identificó *Yarrowia lipolytica*. Para el género *Meyerozyma* se identificó la especie *Meyerozyma guilliermondii*. Asimismo, se identificó una levadura como control positivo SC. Esta levadura de pan corresponde a la industria Maurivin identificada por el proveedor como *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus*. El código de acceso de cada cepa identificada corresponde: 2LJJ1, 2LQCP4, 2RMP3, 4LYP0, 2LJJ6, 2RHP5, 2RYP9, 2LHJ2, 2RMP1, 2LJJ2 y SC. Véase la Tabla 10. Se realizó un árbol filogenético de las levaduras identificadas. Se utilizó el software Mega X (Figura 25).

Tabla 15: Identificación molecular mediante marcadores de la región LSU D1/D2 subunidad mayor ribosomal.

CEPA	LUGAR	ESPECIE	CODIGO ACCESO GB.	IDENTIDAD	COBERTURA	CODIGO NCBI COMPARADO
2LJJ1	Junín	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	MH656393.1	100%	100%	MG009569.1
2LQCP4	Quiulacocha	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	MG018366.1	100%	100%	MK156747.1
2RMP3	Milpo	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	MH656361.1	100%	100%	LC435600.1
4LYP0	Yanamate	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MH656384.1	100%	100%	MH978867.1
2LJJ6	Junín	<i>Yarrowia lipolytica</i>	MH656368.1	99%	100%	MK156747.1
2RHP5	Huaron	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	MH656371.1	100%	100%	MG588939.1
2RYP9	Yanamate	<i>Rhodotorula toruloides</i>	MH656372.1	100%	100%	MH978881.1
2LHJ2	Huacracocha	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MG018368.1	99%	98%	MK028824.1
2RYP4	Yanamate	<i>Pichia fermentans</i>	MH656377.1	99%	98%	MF462777.1
2LJJ2	Junín	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	MH656364.1	100%	100%	MH880169.1
SC	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MH656391.1	100%	100%	MG641147.1

*Gb: genbank

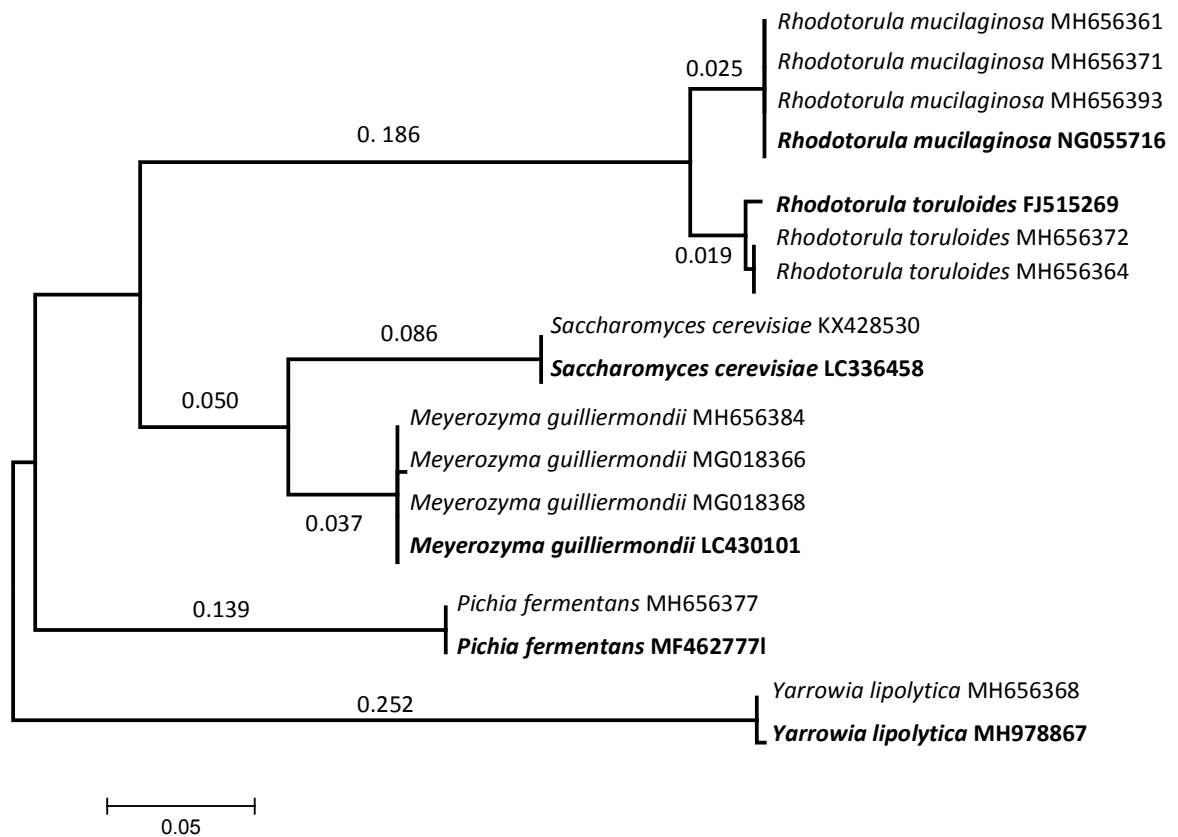


Figura 25. Filogenia Molecular determinada a partir del marcador de la subunidad mayor ribosomal LSU D1/D2 de las levaduras aisladas. El análisis se realizó por el método de máxima parsimonia. El cuál se basó en el modelo de Tamura-Nei. Se analizaron 17 secuencias nucleotídicas, de las cuales 11 son nativas del presente estudio y 6 son cepas referenciadas del genbank (color negro)

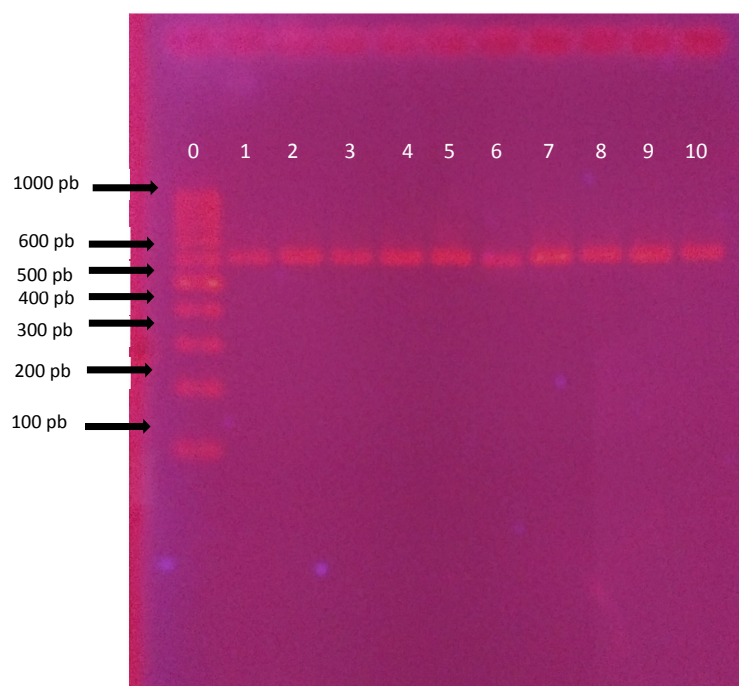


Figura 26. Tamaño de los amplicones de la región LSU D1/D2 de la subunidad ribosomal 28S. Agarosa 1.8% TAE 1x 80v x 80 minutos. Ladder 100 pb. Los amplicones se encuentran enumerados en los carriles del 0 al 10. (0) Ladder 100 pb, (1) SC, (2) 2LJJ1, (3) 2RMP3, (4) 4LYP0, (5) 2LJJ6, (6) 2RHP5, (7) 2LQCP4, (8) 2RYP9, (9) 2LHJ2, (10) 2RYP4. Se determinó que el peso molecular de los productos de PCR es alrededor de los 600 pb.

5.10 Reacción de polimerasa en cadena (PCR) para la amplificación de los cebadores diseñados.

Los cebadores degenerados que amplificaron fueron los siguientes: Ace2 (Figura 27) y GPH1 (Figura 28). Asimismo, los cebadores diseñados ACT y CUP1 también amplificaron (Figura 29). Los ADN que se utilizaron en la prueba fueron las del presente estudio 2LJJ1 y SC. También se utilizaron el ADN de las cepas 2RYP4 y 2LJJ6.

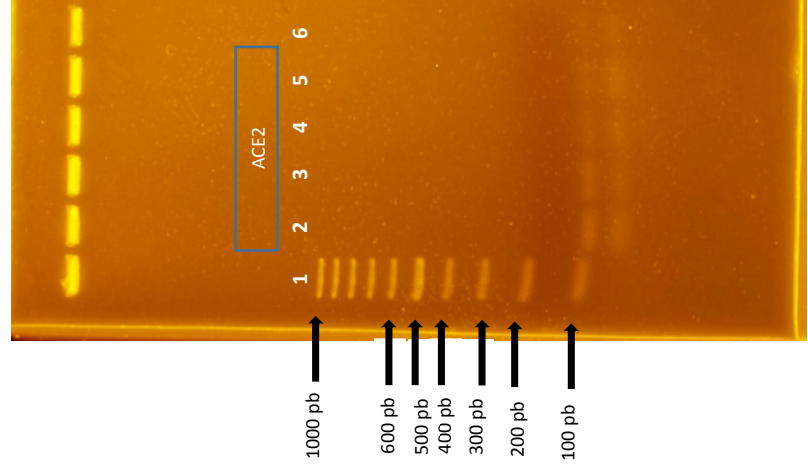


Figura 27. Amplicones del gen ACE2. Agarosa 1.8%. Corrida electroforética en buffer TAE 1X a 80v por 80 minutos. Ladder 100 pb. Los amplicones se encuentran enumerados en los carriles del 1 al 6. (1) Ladder (2) 2LJJ6 (3) 2RYP4 (4) SC (5) 2LJJ1 (6) control negativo. Se determinó que el peso molecular de los productos de PCR es alrededor de los 100 y 200 pb.

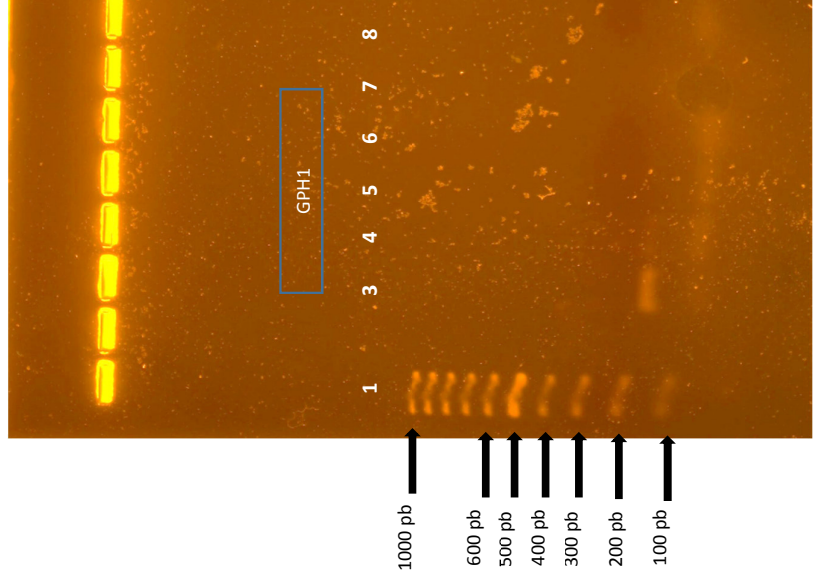


Figura 28. Amplicones del gen GPH1. Agarosa 1.8%. Corrida electroforética en buffer TAE 1X a 80v por 80 minutos. Ladder 100 pb. Los amplicones se encuentran enumerados en los carriles del 1 al 8. (1) Ladder, (3) 2LJJ6, (4) 2RYP4, (5) SC, (6) 2LJJ1, (8) control negativo. Se determinó que el peso molecular de los productos de PCR es alrededor de los 100 y 200 pb.

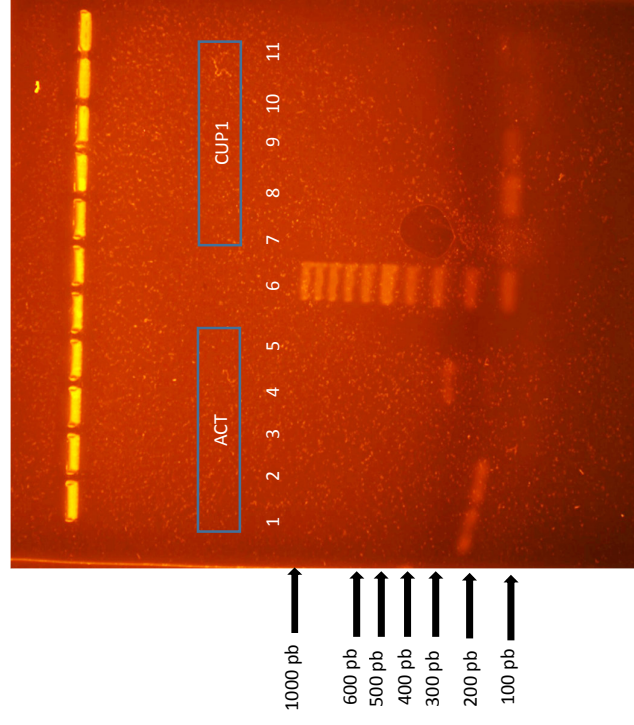


Figura 29. Amplicones del gen ACT y CUP1 en Agarosa 1.8%. Corrida electroforética en buffer TAE 1X a 80v por 80 minutos. Ladder 100 pb. Los amplicones se encuentran enumerados en los carriles del 1 al 11. Para el gen ACT, los carriles están entre el 1 y 5: (1) 2LJJ6, (2) 2RYP4, (3) 2LJJ1, (4) SC, (5) control negativo. Para el gen CUP1 los carriles están entre el 7 y 11: (7) 2LJJ6 (8) 2RYP4 (9) SC (10) 2LJJ1 (11) control negativo. El ladder se encuentra en el carril (6). Se determinó que el peso molecular de los productos de PCR es alrededor de los 100 y 200 pb.

5.11 Estandarización de la síntesis de DNAc a partir del ARNm.

A partir de la extracción de ARN (5.7.2) se sintetizó ADN complementario (ADNc). Se obtuvieron los siguientes resultados según la exposición a metales pesados para la cepa 2LJJ1 (Tabla 16). La concentración de ácidos nucleicos en levaduras no expuestas a metales pesados fue 1800 (ng/μL) con una absorbancia 260/280 1.80. A partir de las levaduras expuestas a concentración letal media (CL50) de Cu y Cd; se determinó, que la concentración de ácidos nucleicos fue 1779 y 1781 (ng/μL) y una absorbancia 260/280 1.78 y 1.81; respectivamente.

Asimismo, se determinó la concentración de ácidos nucleicos ausencia de estrés por metal. En la cepa SC. La concentración fue 1819 (ng/μL) con una absorbancia 260/280 1.82

Tabla 16: Concentración de ácidos nucleicos de ADNc a partir del ARNm.

CEPA	CONDICION DE ESTRÉS	Concentración de ácidos de nucleicos	ABS. 260/280
2LJJ1	SIN EXPOSICION AL METAL	1800	1.80
2LJJ1	CL50 Cu	1779	1.78
2LJJ1	CL50 Cd	1781	1.81
SC	SIN EXPOSICION AL METAL	1819	1.82

Concentración de ácidos nucleicos de ADNc a partir del ARNm de la cepa 2LJJ1. La extracción de ARNm se realizó en levaduras sin exposición de metales. Asimismo, se realizó la extracción de ARN en levaduras expuestas a metales (Cu y Cadmio). Se tomó como cepa control la cepa *Saccharomyces cerevisiae* (SC) sin exposición a metal.

6 DISCUSIÓN

La definición de extremófilo, característica inherente en microbiología a aquellos microorganismos capaces de crecer en zonas "extremas " determinadas. La pregunta surge, determinada ¿por quién? Aunque esta parece sencilla y lógica, hay tres cuestiones filosóficas que requieren una mayor exploración. Primero, ¿qué es "extremo"? Depende del enfoque. La extremofilia se basa en definiciones antropocéntricas Para explicar las deficiencias de la visión antropocéntricas doy 2 ejemplos de una condición "extrema": aquellos microorganismos como un termófilo que muere a 21 °C y un piezófilo que muere a una presión atmosférica normal. Segundo, hay aspectos ecológicos para definir organismos extremotolerantes y extremófilos. Asimismo, ambas definiciones pueden ser fácilmente confundidas porque hay pocas diferencias entre ambos conceptos. Tercero, debe definirse si un extremófilo tiene que mostrar su fisiología extrema durante todas las etapas de crecimiento y en todas las condiciones dadas (Rothschild y Mancinelli, 2001).

La mayoría de los ambientes extremadamente ácidos están asociados con la minería de metales y carbón (Cavicchioli y Torsten 2000). El agua de drenaje ácido-mina es un ejemplo de un ambiente ácido y es un modelo interesante para obtener una mejor comprensión de la vida en condiciones ácidas y para dilucidar las bases de la supervivencia. En nuestro caso, las levaduras fueron aisladas en condiciones de pH ácido, a bajas temperaturas y a altas concentraciones de metales pesados. El concepto integro de nuestras levaduras estaría orientado a las extremófilas. Asimismo, estas levaduras son capaces de tolerar ambientes extremos. Sin embargo, los verdaderos extremófilos exhiben un crecimiento y una fisiología óptima en condiciones extremas (de Silóniz et al. 2002b).

Se identificaron 5 especies de levaduras por el marcador LSU D1/D2 de la subunidad ribosomal 28S *Rhodotorula mucilaginosa*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula toruloides*, *Pichia fermentans* predominantes de los cuerpos de agua de la sierra central del país. Orbegozo (2008) reporta la especie *Picchia guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*). Libkind, en el 2009, reporta aislamiento de levaduras en 5 lagos de la Patagonia, logro aislar 20 especies: 10 especies de levaduras pigmentadas (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula babjevae*, *Rhodotorula laryngis*, *Rhodotorula minuta*, *Dioszegia hungarica*, *Dioszegia fristingensis*, *Sporobolomyces ruberrimus*, *Sporobolomyces longiusculus*, *Sporobolomyces marcillae*, *Rhodospiridium diobotavum*) y 10 levaduras no pigmentadas (*Candida coipomoensis*, *Leucosporidiella creatinivora*, *Leucosporidiella muscorum*, *Cryptococcus albidus*, *Venturia hanliniana*, *Cryptococcus antarcticus*, *Cryptococcus gastricus*, *Cryptococcus saitoi*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Aureobasidium pullulans*). La diversidad de levaduras aisladas en esta investigación difiere con reportada con Libkind, este investigador aisló muestras de cuerpos de agua entre los 1300 a 1700 m.s.n.m. Además, las condiciones fisicoquímicas difieren sustancialmente con las reportadas en el presente trabajo. En el caso de Libkind trabajó con agua prístinas (pH: 7 -8); sin embargo, en la presente investigación el monitoreo se realizó en aguas acidas cercanas a pH 2 y contaminadas con relaves mineros, con altas concentraciones en metales pesados, pHs extremófilos ácidos, temperaturas bajas, restringiendo solo el crecimiento de levaduras adaptadas a estas condiciones extremas.

Aún hay mucho por descubrir sobre la diversidad de levaduras en diversas zonas del planeta inexploradas. Esta brecha de conocimiento demorará mucho tiempo en cerrarse en tanto aún no sean explorados los hábitats ocupados por estos organismos. (Barriga *et al.*, 2011).

Por otra parte, la taxonomía de las levaduras enfrenta desafíos en términos de las especies ya que con frecuencia las levaduras se vuelven a reclasificar. Para contraponer esta deficiencia, las técnicas moleculares desarrolladas durante los últimos 30 años son muy valiosas para la investigación. Los enfoques moleculares son fundamentales para su identificación y clasificación de las levaduras. Es importante entender que muy pocas levaduras (<1% de los aproximadamente 1,5 millones de especies de levaduras que se cree que existen) han sido secuenciadas a partir de los marcadores de la región LSU. Las levaduras son un grupo extremadamente diverso, y como tal, no existe una panacea para la identificación de todos los grupos. Es posible que uno esté trabajando con una levadura no descrito/desconocido que no ha sido previamente secuenciado (Raja, 2017). La metagenómica es una herramienta fundamental para poder romper estos paradigmas. La metagenómica como tal nos revela la diversidad “total” de levaduras presentes en un ecosistema a través de un marcador. Es importante depositar las secuencias en el GenBank, para enriquecer el banco de genes a la vez determinar si ya fueron identificados. Asimismo, los métodos “quimiotaxonómicos” son complementarios para caracterizar las cepas de levadura. Las levaduras se pueden caracterizar de acuerdo a su pigmentación. En este estudio se reporta diferentes tipos de pigmento de acuerdo al género y especie de levaduras. Pigmentación rosada y con secreciones: *Rhodotorula mucilaginosa* y *Rhodotorula toruloides*; y pigmentación blanca: *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia fermentans*, sin embargo, aunque la coloración sea igual existen diferencias como la textura, brillo, olor, viscosidad entre las mismas especies.

Por ejemplo, en la producción de triacilglicerol, Xu *et al.*, (2012) trabajó con *Rhodosporidium toruloides* (*Rhodotorula toruloides*), levadura con potencial aplicación en la industria de biodiesel. Esta levadura puede acumular lípidos intracelulares hasta en un 60% de peso seco y transformarlos a otros lípidos; de

glicerol a triacilglicerol. Así el triacilglicerol puede utilizarse para la producción de biodiesel. Asimismo, en la investigación de Yamada *et al.*, (2017); evaluó, a nivel transcripcional, la producción de ácidos grasos en cepas mutadas de *Rhodospiridium toluroides*.

La cinética de crecimiento de nuestra cepa, del presente trabajo *Rodothorula mucilaginosa*, duro alrededor de las 120 horas. Se determinó que el mayor número de unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) fue 24×10^8 entre 88 horas y 96 horas. La cinética paso de forma directa de la fase exponencial a la de muerte, siendo nula la fase estacionaria. Hari (1993) realizo cinéticas de crecimiento para determinar las condiciones óptimas de producción de biomasa de la cepa *Rhodotorula rubra* para fines biotecnológicos, la cinética duro cerca de 150 horas y determino que la mayor producción de masa fue 18 mg/mL. a las 80 horas. Asimismo, la cinética de crecimiento paso de forma directa de la fase exponencial a la de muerte, similar a la nuestra, obviando la fase estacionaria. Hari determino un mayor rendimiento de biomasa con el medio YM (extracto de levadura/extracto de malta medio, DIFCO). Este medio está compuesto por dextrosa, peptona y extracto de levadura. Similar a nuestro medio, utilizamos peptona (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L), D-glucosa (30 g/L), el rendimiento de biomasa con nuestro medio fue menor, en comparación con el medio YM.

Se determinó que la concentración letal media (CL_{50}) de nuestra levadura nativa *Rhodotorula mucilaginosa*, cepa 2LJJ1, para los metales cobre (Cu), mercurio (Hg) y cromo (Cr) son cercanos a los reportados por Jin (2008) con algunos metales. En el cual trabajó con una levadura de pan *Saccharomyces cerevisiae*, reporta que la CL_{50} para los metales: Cu 7 mM, Cd 0.025 mM, Hg 0.047 mM y Cr 0.9 mM. En comparación con nuestra cepa 2LJJ1 *Rhodotorula mucilaginosa*, la CL_{50} con los metales: Cu 1.42 mM, Cd 0.58 mM, Hg 0.05 mM y para el Cr entre 0.7-1.15 mM.

Según Jin, la CL₅₀ para el Cu, fue 7 mM con *Saccharomyces cerevisiae* (cepa mutante), cerca de 5 veces más resistentes que la levadura del presente trabajo. Contrario con el Cd, Jin reporta la CL₅₀ fue 0.025 mM, nuestra cepa presenta el doble de resistencia. 0.58 mM.

Nuestra cepa nativa presenta diferencias en la CL₅₀ en comparación con la cepa mutante de Jin. Las cepas mutantes fueron modificadas a nivel del genoma, en estas se incorporaron los genes *kanMX* (resistencia a Kanamicina), *ADE2* (enzima que cataliza la biosíntesis de nucleótidos de purina) y *MET15* (enzima que cataliza la biosíntesis de nucleótidos de metionina). Estos genes fueron incorporados a *Saccharomyces cerevisiae*, para estudios de expresión, que influyen en las rutas metabólicas a la resistencia frente los metales pesados, excepto para el Cd. Nuestros estudios de CL₅₀ en levaduras nativas de lagunas Altoandinas impactadas con relaves mineros, presentan CL₅₀ mayores para Cd y menores para Cu y Cr. En nuestra levadura *Rhodotorula mucilaginosa* estos resultados son esenciales para estudiar la expresión diferencial de genes y proteínas en condiciones de estrés frente a estos metales pesados. Las levaduras siempre tienen que responder frente a un estímulo de su entorno y poder estudiar dicha respuesta. Esta respuesta puede ser evaluada en PCR en tiempo real. Sin embargo, es necesario poder amplificar los genes que expresan las proteínas en respuesta a un estímulo por metales pesados. Para amplificar dichos genes es necesario el diseño de cebadores que puedan cumplir dicha función.

En respuesta a esta necesidad diseñamos cebadores degenerados y cebadores; a partir de los genes citados diversos autores (Jhin *et al*, 2008). Asimismo, para los genes que fueron reportados en otras literaturas. Para la selección de genes, no todos estaban reportados en diferentes levaduras, según el NCBI, su base de datos carece de individuos modelo para tomar sus secuencias aminoacídicas y

nucleotídicas, y posteriormente alinearlas. Para la selección se descartaron aquellos genes codificantes que no presentaban por lo menos 5 organismos modelo en la taxa Fungi.

Peterson y Kurtzman (1991) determinaron 2 dominios del ARN ribosómico (ARNr) de la subunidad mayor (28S) para resolver especies que eran variables a la identificación de otros marcadores. Kurtzman y Robnett (1998) ampliaron el trabajo anterior mediante la secuenciación de ambos dominios 1 y 2 (aproximadamente 600 nucleótidos) de ADN ribosomal 26S (ADNr) para todas las levaduras conocidas. Proporcionaron así una base de datos disponible universalmente para la identificación rápida de especies conocidas, la detección de nuevas especies, y colocación filogenética inicial de las especies. Si aceptamos que se conoce menos del 1% de las especies existentes y que las tecnologías de secuenciación actuales permiten la detección rápida de nuevas especies, el factor limitante para presentar nuevas especies es el tiempo requerido para la descripción formal, que incluye información sobre estados vegetativos y sexuales, fermentación y reacciones de asimilación, y donde se aisló.

Kurtzman y Fell (1998) utilizaron la base de datos D1/D2 para el estudio taxonómico de levaduras. Detectaron un gran número de nuevas especies. El número de especies conocidas se duplicó desde la publicación de la cuarta edición más reciente "THE YEAST". En nuestra investigación nos permitió identificar de forma rápida y precisa las levaduras aisladas. Se identificaron las cepas 2LJJ1, 2LQCP4, 2RMP3, 4LYP0, 2LJJ6, 2RHP5, 2RYP9, 2LHJ2, 2RYP4, 2LJJ2 y nuestra levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Se secuenció aproximadamente 600 nucleótidos y se realizó la búsqueda de BLAST en GenBank.

El enfoque de nuestra discusión sobre la identificación de especies a partir de secuencias de genes ha estado en el ADNr. Una de las principales ventajas del ADNr es que está presente en todos los organismos vivos, tiene un origen evolutivo común, se presenta como copias múltiples y es fácil. Sin embargo, la necesidad de múltiples cebadores parece ser un problema común para nuevas especies de levaduras. También, la secuenciación de genes codificantes debido a las frecuentes sustituciones de nucleótidos.

Durante mucho tiempo se ha pensado que las duplicaciones de genes son una fuerza impulsora importante en la evolución biológica. Este mecanismo proporciona una copia adicional que luego puede modificarse para producir una "función nueva" (Ohno 1970) sin perder, al menos al principio, la función original y, por lo tanto, sin riesgo. La importancia de este mecanismo en la evolución ya se ha evidenciado en muchos casos, Wolfe y Shields (1997) han propuesto que se produjo una duplicación global del genoma antes de la especiación de *Saccharomyces* (sensu stricto). Esto parece ser confirmado por el análisis de la secuencia completa de *Kluyveromyces waltii* (Kellis *et al.* 2004). Los análisis adicionales de los diversos genomas ahora a nuestra disposición revelaron una gran variedad de eventos que pueden superponer sus efectos anteriores o posteriores al evento de duplicación global.

Uno podría preguntarse si la comparación de secuencias genómicas codificantes, propuesta en la presente investigación, puede ayudar a descubrir secuencias conservadas funcionalmente. En la búsqueda de genes ortólogos se descartó las regiones intergénicas. Las principales razones son: 1. Las regiones intergénicas divergen rápidamente en comparación con las secuencias codificantes y 2. Las secuencias reguladoras son generalmente cortas y a menudo, tolerantes a algunas

variaciones de secuencia. Asimismo, Rosa y Peter (2006) mencionan que si los motivos de unión al ADN están bien conservados, el resto de las secuencias divergen muy rápidamente. Esto significa que los homólogos funcionales probablemente podrían identificarse con bastante facilidad en las especies cercanas a *Saccharomyces cerevisiae* como en el caso de las secuencias cis.

En consecuencia, se pueden considerar dos posibilidades: 1. El mismo conjunto de genes está corregido 2. Solo la función global de la red (como el control de la energía y la producción de metabolitos específicos) se conserva, pero se logra mediante la regulación de un conjunto modificado de genes. Asimismo, Rose y Peter, mencionan que las especies de levaduras viven en diferentes nichos ecológicos, pero sus genomas revelan muchas características conservadas. En esta investigación recomendamos investigar a nivel de poblaciones como las especies explotan, esta información genómica básica para adaptarse a su nuevo entorno. Se presupone que la evolución de la función puede ser adquirida por diferentes mecanismos, basados en grandes reordenamientos cromosómicos, ganancia o pérdida de genes o diferencias en la expresión de genes.

Rose (2003) presenta la utilidad en el diseño de primers utilizando la estrategia “Consensus degenerate Hibrid Oligonucleotide Primer” CODEHOP para la identificación de genes codificantes en un determinado grupo de proteínas de genomas virales. Si bien el enfoque de Rose (2005) fue sobre la familia de los herpesvirus, otras familias de proteínas pueden ser fácilmente identificadas usando enfoques análogos, como es el caso de las levaduras. Esta técnica se centra en la determinación de genes homólogos en la diversidad de familias de plantas superiores (Morant et al., 2002), y en la caracterización de los genomas virales (Rose et al., 2003). El objetivo en el presente fue diseñar cebadores degenerados

de los genes codificantes (cds) de las proteínas PRC1, fitoquelatina; ATM1, transportador de la membrana mitocondrial (familia de las proteínas ABC); ENA1, bomba de sodio del citosol; CYS4, (cystathionine beta sintetasa), ACE2, (factor de transcripción, activador de la CUP1) y GPH1 (glucógeno fosforilasa). En el anexo 15, se describen los genes seleccionados para el diseño de los cebadores. Para su diseño se tomó como punto de partida la familia de proteína a la cual pertenecía cada gen codificante.

Para el diseño de cebadores degenerados con una amplitud taxonómica; como es el caso de las levaduras. Lewis (2011), recomienda disminuir el número de bases degeneradas en el extremo 3". Nuestros cebadores degenerados, del presente estudio, fueron diseñados con el siguiente número de bases degeneradas: para el cebador ATM1 su cebador líder posee 16 combinaciones y su cebador reverso posee también posee 12; para el cebador GPH1 su cebador líder posee 4 combinaciones y su cebador reverso posee 4; para el cebador CYS4 su cebador líder posee 3 combinación y su cebador reverso posee 16; para el cebador ENA1 su cebador libre posee 4 combinaciones y su cebador reverso posee 8; para el cebador PRC1 su cebador líder posee 8 combinaciones y su cebador reverso 12; para el cebador ACE2 su cebador líder posee 8 combinaciones y su cebador reverso 2.

Asimismo, Lewis afirma, que no es prioridad el consenso de nucleótidos. El consenso debe partir del consenso de alineamiento de las secuencias de aminoácidos. La finalidad es que un cebador degenerado tenga la mayor especificidad posible en desventaja con las bases degeneradas que lo conforman, los cebadores degenerados pueden presentar hasta 64 combinaciones Rose, et al., 2005.

Nuestros estudios muestran que los cebadores degenerados diseñados amplificaron genes codificantes como GPH1 y ACE2. Asimismo, amplificaron los cebadores diseñados de forma convencional como el gen codificante CUP1 y B-ACT como control endógeno. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, Culotta *et al.*, (1994), demostró que el gen CUP1 está asociado a las metalotioneínas (MT) y también la existencia de un nuevo tipo de MT codificado por el gen CRS5. En la publicación, demuestran que *Saccharomyces cerevisiae* posee una proteína adicional tipo MT, que es distinto a nivel estructural y genético del CUP1. Esta nueva proteína del tipo MT es codificado por el gen CRS5. Demostró que el gen CRS5 confería niveles de resistencia muy altos frente al cobre. Además demuestran que el gen ACE1 es el factor de transcripción que regula la activación del gen CRS5 y del gen CUP1; genes que confieren resistencia frente a niveles altos de cobre en *Saccharomyces cerevisiae*. Según Culotta, las MT del gen CRS5 tienen secuencias aminoacídicas tipo cisteína. Estos aminoácidos sugieren una función de unión al metal. Esto explicaría, la propiedad de la MT de CRS5 para quelar y secuestrar los iones de cobre. A diferencia de CUP1, el gen CRS5 parece expresarse constitutivamente a un nivel basal y en presencia de cobre sus niveles de expresión aumentan.

Buchman *et al.* 1989, demostraron la expresión del gen CUP2 es constitutivo y que se comporta como un factor de transcripción de unión a ADN. Asimismo, demostró que el gen CUP2 está regulado por la presencia o ausencia del Cu. Gralla *et al.*, 1991, demuestra que el factor de transcripción Ace2 tiene un sitio de unión en la región promotora del gen superóxido dismutasa (SOD) de levadura *Saccharomyces cerevisiae* expuesta a cobre. Asimismo, esta región promotora muestra una fuerte homología con el sitio de unión del ACE1 en el promotor CUP. Esta región homóloga está conservada en siete residuos de la guanina y que es importante para la unión

de ACE1 en ambas secuencias promotoras de los genes SOD y CUP1. Sin embargo, Buchman hace hincapié en la diferencia que tienen ambas regiones promotoras. El nivel de respuesta frente al inductor (cobre) en el caso del promotor SOD es menor en comparación con la del promotor CUP1. En consecuencia la afinidad por el factor (los sitios de unión del promotor) de transcripción Ace2 es mayor en el caso del promotor CUP1 en comparación de la región promotora SOD. Gross *et al.*, 2012, demostró la respuesta diferenciada de dos factores de transcripción Mac1 y Ace1 en *Saccharomyces cerevisiae* frente al cobre. Experimento con chips de microarrays para identificar un conjunto de genes en levaduras; estos genes deberían expresarse de forma diferenciada en condiciones de crecimiento celular en deficiencia (Mac1) o en exceso de cobre (Ace1).

Mac1 media la activación de genes en condiciones de deficiencia de cobre. Los genes que activa son FRE1, FRE7, CTR1 y CTR3; codifican proteínas que tienen afinidad en la absorción del Cu. Además, hay genes que son regulados de forma negativa. ZRT1 y ZRT2. Estos dos genes son transportadores de Zinc (Zn) y están regulados de forma negativa en células que abunda el Zn. Por otro lado, en presencia de altas concentraciones de cobre el factor de transcripción Ace1 estimula la expresión de CUP1. Los genes objetivos conocidos del Ace1 son tres: incluyen los dos genes de metalotioneína CUP1 y CRS5, y la SOD1 superóxido dismutasa. Asimismo, Gross reporta que se activaron los genes FET3 y FTR1 en presencia del cobre. Estos genes codifican proteínas que absorben el hierro. Estos genes son activados por el factor transcripcional Aft1. Una explicación sería que el cobre es importante para la absorción de Fe. Porque cumple su rol como cofactor de Fet3. Todas estas investigaciones demuestran la asociación de factores de transcripción y genes codificantes que se expresan en respuesta a los metales. Estos cebadores pueden ayudarnos a entender cuál es la respuesta frente a diferentes condiciones de metales en levaduras. No solo en *Saccharomyces*

cerevisiae. Nuestras levaduras nativas acidófilas, fueron aisladas de los cuerpos de agua contaminada por metales pesados en zonas Altoandinas.

Nuestros estudios muestran que los cebadores degenerados diseñados amplificaron genes codificantes GPH1, según Wohler *et al.*, (2001). El gen GPH1, que codifica la glucógeno fosforilasa, responde al metabolismo del glucógeno. A su vez, este metabolismo responde a factores estresantes ambientales, como la limitación de nutrientes y choque térmico. Asimismo elementos trazas (como los metales pesados) del ambiente, como limitantes o como excedentes generan una respuesta en las levaduras. La respuesta fue 30 veces mayor cuando se evalúa a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en fase estacionaria.

Así mismo algunos cebadores degenerados no amplificaron para los genes codificantes: PCR1, AMT1, ENA1, CYS4. Según New England Biolabs (2018), hay muchos factores que pueden influir en que el cebador, no amplifique mediante la PCR un marcador a partir de una muestra de ADN, en el cual pueda estar presente dicho marcador. Debe evaluarse todos los parámetros que propone la guía. Variar el número de ciclos de la PCR, menor tiempo de extensión, aumentar las concentraciones de Mg en el rango 0.2 – 1 mM, evaluar la temperatura de emparejamiento, repetir la reacción usando reactivos nuevos, realizar pruebas con gradiente de temperatura en 5 grados menor a la temperatura de emparejamiento teórica, aumentar las concentraciones de cebadores 0.05 – 1 μ M. Una vez considerados todos estos parámetros se podrá afirmar la validez de grupo de cebadores que no amplificaron.

Para validar estos cebadores como marcadores de contaminación ambiental por metales pesados se propone la siguiente metodología (Figura 49). Es necesario

realizar investigaciones futuras orientadas a la validación en campo. Realizar RNAseq de aquellos genes codificantes y evaluar el comportamiento del ARN total y sus productos del ARNm. Para tener un mayor conocimiento del metabolismo de las levaduras frente a la exposición a metales pesados. Finalmente, desarrollar una matriz, en la cual, se inmovilizará pequeñas porciones de ácidos nucleicos capaces de realizar una respuesta cuantitativa y cualitativa en respuesta a los ácidos nucleicos presentes en el agua evaluada (calidad del agua). Con el objetivo de emitir un diagnostico real con respecto al cuerpo de agua analizada.

7 CONCLUSIONES

- Es factible amplificar genes codificantes de expresión a metales con los cebadores diseñados mediante la estrategia CODEHOP. En nuestro estudio los cebadores diseñados fueron capaces de amplificar los genes ACE2 y GPH1.
- Los cebadores diseñados por la estrategia CODEHOP, es uno de los primeros reportes en nuestro país que van a contribuir en la información y conocimiento de las familias de proteínas de diversas especies de levaduras extremófilas presentes en cuerpos de agua Altoandinos contaminados con relaves mineros.
- Nuestros estudios de la concentración letal media (CL50) de cromo (Cr), cadmio (Cd) y cobre (Cu) y la cinética de crecimiento en la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* aislados de la relavera Yanamate impactados con relaves mineros. Nos permitió determinar, la **concentración** y el tiempo de enfrentamiento de las levaduras a los metales pesados y estudiar un modelo de expresión de genes en condiciones de estrés en el presente estudio.

8 RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer estudios de metagenómica de las levaduras con sus marcadores poblacionales predominantes, por ejemplo el LSU. El aislamiento convencional, con medio de cultivo YPG, es insuficiente para conocer la diversidad de levaduras cultivables presentes en los cuerpos de aguas de la sierra central del Perú.
- Se recomienda validar los cebadores en campo. Monitorear los cuerpos de agua de diversas lagunas impactadas y no impactadas por metales pesados y aplicar la tecnología de Next Generation Sequence (NGS) para la extracción de ARN total, RNA- seq.

9 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Abbas, S. H., Ismail, I. M., Mostafa, T. M., & Sulaymon, A. H. (2014). Biosorption of heavy metals: a review. *J. Chem. Sci. Technol*, 3(4), 74-102.
2. Abd-Elsalam, K. A. (2003). Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *african Journal of biotechnology*, 2(5), 91-95.
3. Akcil, A., Erust, C., Ozdemiroglu, S., Fonti, V., & Beolchini, F. (2015). A review of approaches and techniques used in aquatic contaminated sediments: metal removal and stabilization by chemical and biotechnological processes. *Journal of Cleaner Production*, 86, 24-36.
4. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). *Nucl. Acids Res.* 25, 3389-3402.
5. Andrews, G. K. (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemistry Pharmacol*, 59:95-104.
6. Aragon, A. D., Quiñones, G. A., Thomas, E. V., Roy, S., & Werner-Washburne, M. (2006). Release of extraction-resistant mRNA in stationary phase *Saccharomyces cerevisiae* produces a massive increase in transcript abundance in response to stress. *Genome biology*, 7(2), R9.
7. Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2017). A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. *International journal of environmental research and public health*, 14(1), 94.
8. Banco Mundial. (2005). Riqueza y sostenibilidad: dimensiones sociales y ambientales de la minería en el Perú. Lima.
9. Banerjee P. C. (2004). Genetics of metal resistance in acidophilic prokaryotes of acidic mine environments. *Indian J Exp Biol.* 42(1):9-25.

10. Bankar, A., Zinjarde, S., Shinde, M., Gopalghare, G., & Ravikumar, A. (2018). Heavy metal tolerance in marine strains of *Yarrowia lipolytica*. *Extremophiles*, 1-12.
11. Baniamam, M. (2014). Determination of Lethal Concentration (LC50) Values of Vanadium and Toxicity Effect on the Growth of *Artemia urmiana* and *A. Franciscana*. *Survey in Fisheries Sciences*, 1(1), 1-8.
12. Barriga, E. J. C., Libkind, D., Briones, A. I., Iranzo, J. U., Portero, P., Roberts, I., & Rosa, C. A. (2011). Yeasts biodiversity and its significance: case studies in natural and human-related environments, ex situ preservation, applications and challenges. In *Changing Diversity in Changing Environment*. InTech.
13. Brar, S.K.; Verma, M.; Surampalli, R.; Misra, K.; Tyagi, R.; Meunier, N.; Blais, J. (2006). Bioremediation of hazardous wastes—A review. *Pract. Period. Hazard. Toxic Radioact. Waste Manag.*, 10, 59–72.
14. Buchman, C., Skroch, P., Welch, J., Fogel, S., & Karin, M. (1989). The CUP2 gene product, regulator of yeast metallothionein expression, is a copper-activated DNA-binding protein. *Molecular and cellular biology*, 9(9), 4091-4095.
15. Cavicchioli R, Torsten T. (2000). *Extremophiles*. In: Lederberg J (ed) *Encyclopedia of microbiology*, vol 2, 2nd edn. Academic, San Diego, pp 317-337.
16. Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88(11), 1707-1719.
17. Culotta, V. C., Howard, W. R., & Liu, X. F. (1994). CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(41), 25295-25302.

18. David R. Livingstone. (1993). *Biotechnology and Pollution Monitoring: Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment* NERC Plymouth Marine Laboratory, Citadel Hill, Plymouth, Devon PL12PB, UKJ. *Chem. Tech. Biotechnol.*, (57), 195-211.
19. de Silóniz, M. I., Payo, E. M., Callejo, M. A., Marquina, D., & Peinado, J. M. (2002). Environmental adaptation factors of two yeasts isolated from the leachate of a uranium mineral heap. *FEMS Microbiology Letters*, 210(2), 233-237.
20. Dixit, R., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U. B., Sahu, A., Shukla, R., ... & Paul, D. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 7(2), 2189-2212.
21. Doyle, J. J. (1991). DNA protocols for plants. pp. 283-293 in: G. Hewitt, A. W. B.
22. Environmental Protection Agency. (2003). *Federal Register. Unified Agenda*. Vol. 68, No. 101:31111-30962.
23. Glave, M. (2007). *La minería peruana: lo que sabemos y lo que aún nos falta por saber*. MISC.
24. Gomar-Alba, M., Morcillo-Parra, M. Á., & Olmo, M. (2015). Response of yeast cells to high glucose involves molecular and physiological differences when compared to other osmostress conditions. *FEMS yeast research*, 15(5).
25. Gadd, G. M. (2000). Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current opinion in biotechnology*, 11(3), 271-279.

26. Gralla, E. B., Thiele, D. J., Silar, P., & Valentine, J. S. (1991). ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(19), 8558-8562.
27. Granger L.M., Perlot p., Goma Go and Pareilleux A. (1992). Kinetics of growth of *Rhodotorula glutinis* and fatty acid production *Applied Microbiology and Biothechnology* 37:13-17
28. Gross, C., Kelleher, M., Iyer, V. R., Brown, P. O., & Winge, D. R. (2000). Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *Journal of biological chemistry*, 275(41), 32310-32316.
29. Gu, M. B., Mitchell, R. J. y Kim, B. C. (2004). Whole-cell-based biosensors for environmental biomonitoring and application. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 87:269-305.
30. Harrison, J. J., Ceri, H., Yerly, J., Rabiei, M., Hu, Y., Martinuzzi, R., & Turner, R. J. (2007). Metal ions may suppress or enhance cellular differentiation in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 73(15), 4940-4949.
31. Haq, F., Mahoney, M. y Koropatnick, J. (2003). Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res*, 533:211-226.
32. Hill, M. K. (2004). *Understanding environmental pollution*. Cambridge UnivesityPress. p. 486.
33. Hohmann, S., & Mager, W. H. (Eds.). (2007). *Yeast stress responses* (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
34. Hosiner, D., Gerber, S., Lichtenberg-Frate, H., Glaser, W., Schüller, C., & Klipp, E. (2014). Impact of acute metal stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 9(1), e83330.

35. Jin, Y. H., Dunlap, P. E., McBride, S. J., Al-Refai, H., Bushel, P. R., & Freedman, J. H. (2008). Global transcriptome and deletome profiles of yeast exposed to transition metals. *PLoS genetics*, 4(4), e1000053.
36. Johansson, I., & Somasundaran, P. (Eds.). (2007). *Handbook for Cleaning/decontamination of Surfaces*. Elsevier.
37. Kägi, J. H. R., Suzuki, K., Imura, N. y Rimura, M. (1993). Evolution, Structure and Chemical Activity of Class I Metallothioneins: an Overview. En *Metallothionein III*. (eds.). Birkhauser-Verlag, Basel. 29-55.
38. Kan, G., Wang, X., Jiang, J., Zhang, C., Chi, M., Ju, Y., & Shi, C. (2018). Copper stress response in yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AN 5 isolated from sea ice, Antarctic. *MicrobiologyOpen*, e00657.
39. Katju, V., Farslow, J. C., & Bergthorsson, U. (2009). Variation in gene duplicates with low synonymous divergence in *Saccharomyces cerevisiae* relative to *Caenorhabditis elegans*. *Genome biology*, 10(7), R75.
40. Kellis, M., Patterson, N., Birren, B., Berger, B., & Lander, E. S. (2004). Methods in comparative genomics: genome correspondence, gene identification and regulatory motif discovery. *Journal of Computational Biology*, 11(2-3), 319-355.
41. Kneer, R., Kutchan, T. M., Hochberger, A., & Zenk, M. H. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatins. *Archives of microbiology*, 157(4), 305-310.
42. Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
43. Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S)

- ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(4), 331-371.
44. Kurtzman, C., Fell, J. W., & Boekhout, T. (Eds.). (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.
 45. Lee, K. L., Buckely, H.R. y Campbell, C. C. (1975). An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Journal of Medicine and Veterinary Micology*. 13, 145-153.
 46. Lewis, C. A., Bilkhu, S., Robert, V., Eberhardt, U., Szoke, S., Seifert, K. A., & Lévesque, C. A. (2011). Identification of fungal DNA barcode targets and PCR primers based on Pfam protein families and taxonomic hierarchy. *Open Appl Inform J*, 5, 30-44.
 47. Libkind, D., Moliné, M., Sampaio, J. P., & Van Broock, M. (2009). Yeasts from high-altitude lakes: influence of UV radiation. *FEMS microbiology ecology*, 69(3), 353-362.
 48. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
 49. Madigan MT, Martinko JM, Parker J (1997) *Brock biology of microorganisms*. 8th edn. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
 50. Mani, D., & Kumar, C. (2014). Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(3), 843-872.
 51. Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, He J, Lanczycki CJ, Lu S, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang

- D, Zheng C, Geer LY, Bryant SH A et al. (2017). "CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures." *Nucleic Acids Res.* 45(D1):D200-D203.
52. Ministerio de Energía y Minas. 2013. "Boletín Estadístico de Minería, MEM, N° 01-, Lima, Perú".
53. Ministerio del Ambiente (MINAM), Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental (OEFA), Tribunal de Fiscalización Ambiental. RESOLUCIÓN N° 004-2015-OEFA/TFA-SEM.
54. Morant, M., Hehn, A., & Werck-Reichhart, D. (2002). Conservation and diversity of gene families explored using the CODEHOP strategy in higher plants. *BMC plant biology*, 2(1), 7.
55. Moore, M. N. & Simpson, M. G. (1992). Molecular and cellular pathology in environmental impact assessment. *Aquatic Toxicology*. 22 313-22.
56. New England Biolabs. PCR Troubleshooting Guide. (2018). Inc. <https://www.neb.com/tools-and-resources/troubleshooting-guides/pcr-troubleshooting-guide>.
57. O'Brien, S. J., & Evermann, J. F. (1988). Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 3(10), 254-259.
58. O'Brien, S. J., Roelke, M. E., Marker, L., Newman, A., Winkler, C. A., Meltzer, D., ... & Wildt, D. E. (1985). Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science*, 227(4693), 1428-1434.
59. Ohno S (1970) *Evolution by gene duplication*. Springer, Berlin Heidelberg New York.
60. Petersen J. H. *The Kingdom of Fungi*. (2013). Princeton University Press. PRINCETON and OXFORD.

61. Peterson, S. W., & Kurtzman, C. P. (1991). Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. *Systematic and applied microbiology*, 14(2), 124-129.
62. Peña, Carlos E., Dean E. Carter and Felix Ayala-Fierro. (2001). *Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental*. Distributed on the Internet via the Southwest Hazardous Waste Program website at <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>.
63. Ravinder P. K., Hari, Thakor Patel and Antonio M. Martin. (1993). Growth kinetics of *Rhodotorula rubra* on different substrates. *Journal of Basic Microbiology Environment-Health-Techniques*. 33 (6): 379-388
64. Report on Carcinogens. (2011). U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service National Toxicology Program. (20), 80.
65. Rosa, C., & Peter, G. (2006). Biodiversity and ecophysiology of yeasts (pp. 370-417). Berlin: Springer.
66. Rose, T. M., Ryan, J. T., Schultz, E. R., Raden, B. W., & Tsai, C. C. (2003). Analysis of 4.3 kilobases of divergent locus B of macaque retroperitoneal fibromatosis-associated herpesvirus reveals a close similarity in gene sequence and genome organization to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of virology*, 77(9), 5084-5097.
67. Rose, T. M., Henikoff, J. G., & Henikoff, S. (2003). CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3763–3766.
68. Rothschild LJ, Mancinelli RL (2001) Life in extreme environments. *Nature* 409:1092–1101.
69. Satyanarayana, T., Littlechild, J., & Kawarabayasi, Y. (2013). Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology. *In* *biotechnology of thermophiles*, p 179. Springer.

70. Scherens, B., and A. Goffeau. (2004). The uses of genome-wide yeast mutant collections. *Genome Biol.* 5: 229.
71. Singh, P., Raghukumar, C., Parvatkar, R. R., & Mascarenhas-Pereira, M. B. L. (2013). Heavy metal tolerance in the psychrotolerant *Cryptococcus* sp. isolated from deep-sea sediments of the Central Indian Basin. *Yeast*, 30(3), 93-101.
72. Sharma, P.K.; Balkwill, D.L.; Frenkel, A.; Vairavamurthy, M.A. (2000). A new *Klebsiella planticola* strain (Cd-1) grows anaerobically at high cadmium concentrations and precipitates cadmium sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3083–3087.
73. Tamura K. and Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
74. Winzeler, E. A., D. D. Shoemaker, A. Astromoff, H. Liang, K. Anderson et al. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285: 901–906.
75. Su, C. (2014). A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: Situation, impact and remediation techniques. *Environ. Skept. Crit.*, 3, 24–38.
76. Wei, W.; Liu, X.; Sun, P.; Wang, X.; Zhu, H.; Hong, M.; Mao, Z.-W.; Zhao, J. (2014). Simple whole-cell biodetection and bioremediation of heavy metals based on an engineered lead-specific operon. *Environ. Sci. Technol.*, 48, 3363–3371.
77. Wohler Sunnarborg, S., Miller, S. P., Unnikrishnan, I., & LaPorte, D. C. (2001). Expression of the yeast glycogen phosphorylase gene is regulated

by stress-response elements and by the HOG MAP kinase pathway. *Yeast*, 18(16), 1505-1514.

78. Wu, G.; Kang, H.; Zhang, X.; Shao, H.; Chu, L.; Ruan, C. (2010). A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: Issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. *J. Hazard. Mater.* 174, 1–8.
79. Xu, J., Zhao, X., Wang, W., Du, W., & Liu, D. (2012). Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. *Biochemical engineering journal*, 65, 30-36.
80. Yamada, R., Kashiwara, T., & Ogino, H. (2017). Improvement of lipid production by the oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* through UV mutagenesis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(5), 99.
81. Winstanley, C. R. A. I. G., Morgan, J. A., Pickup, R. W., & Saunders, J. R. (1991). Use of a *xylE* marker gene to monitor survival of recombinant *Pseudomonas putida* populations in lake water by culture on nonselective media. *Applied and environmental microbiology*, 57(7), 1905-1913.
82. Wolfe, K. H., & Shields, D. C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, 387(6634), 708.

10 ANEXOS

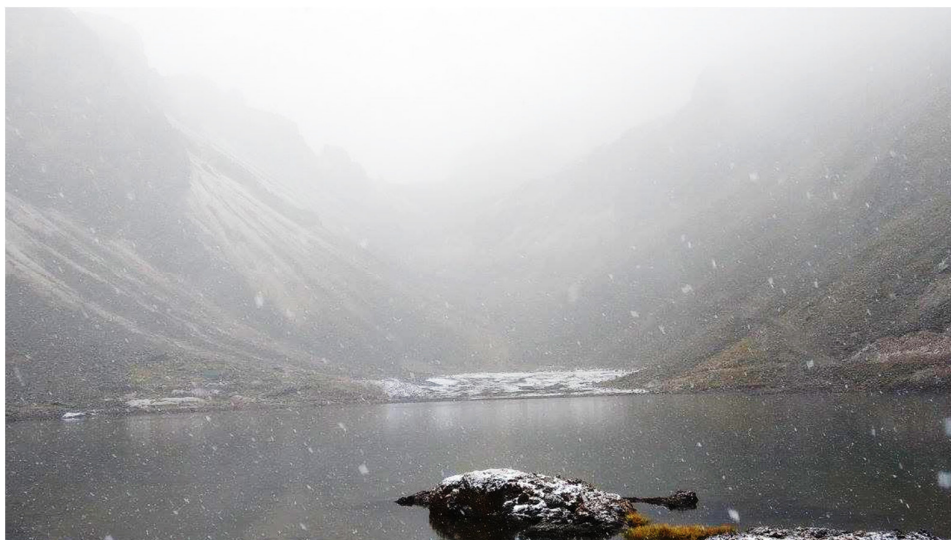


Figura 30. Monitoreo Laguna Santa Catalina. Región Junín, Perú.

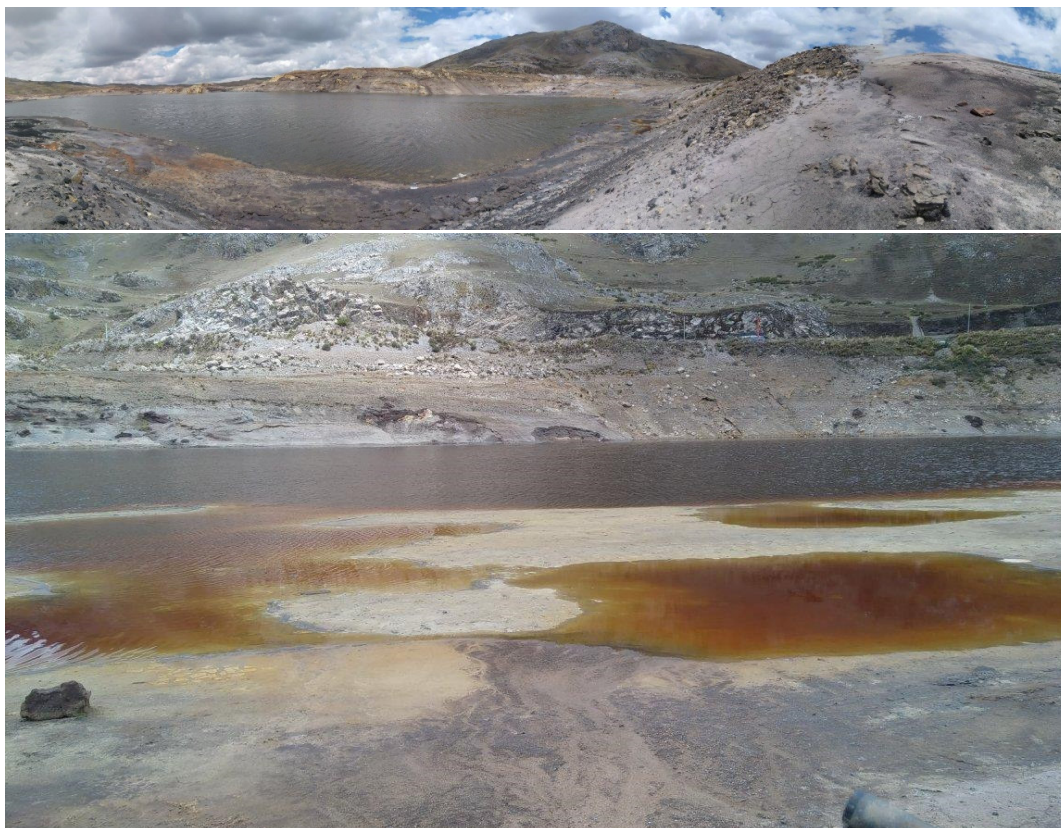


Figura 31. Monitoreo de la relavera Yanamate. Región Cerro de Pasco, Perú.



Figura 32. Monitoreo Laguna Huacracocha. Región Cerro de Pasco, Perú.



Figura 33. Monitoreo Laguna Milpo. Región Cerro de Pasco, Perú.



Figura 34: Estaciones del monitoreo de lagos y lagunas de la sierra central del Perú - proyecto FINCYT 2014.

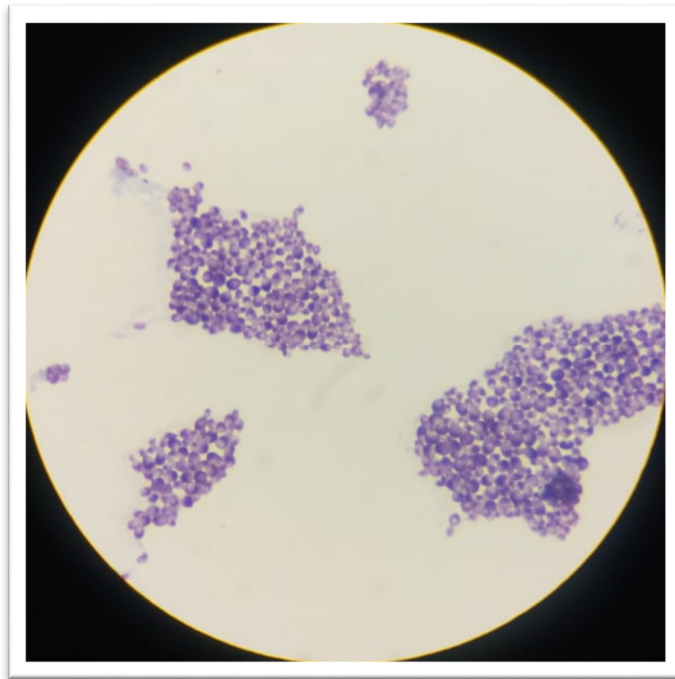


Figura 35. Tinción Gram de la levadura 2LJJ1. *Rhodotorula mucilaginosa*

Tabla 17. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a metales pesados. Se enfrentaron 4 levaduras a 3 metales: cadmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr). Las concentraciones de metales varían de acuerdo a la levadura. Para el Cd desde 100 ppm hasta 250 ppm; para el Cu desde 50 ppm hasta 250 ppm y para el Cr desde 50 ppm hasta 150 ppm.

CEPA	CONTROL	METAL - (ppm)	lectura 1	lectura 2	lectura 3	promedio	Máx	Mín	dmáx	dmin	% células presentes
2LJJ1	1.516	Cd - 300	0.031	0.081	0.053	0.055	0.081	0.031	3%	2%	4
		Cu - 250	0.443	0.423	0.629	0.498	0.629	0.423	13%	8%	33
		Cr - 200	0.784	0.650	0.884	0.773	0.884	0.650	11%	12%	51
2RHP5	1.164	Cd - 200	0.192	0.197	0.198	0.196	0.198	0.192	0%	0%	17
		Cu - 300	0.304	0.307	0.308	0.306	0.308	0.304	0%	0%	26
		Cr - 150	0.194	0.174	0.175	0.181	0.194	0.174	1%	1%	16
2LHJ2	2.864	Cd - 200	0.525	0.501	0.528	0.518	0.528	0.501	1%	2%	18
		Cu - 250	0.888	1.020	0.897	0.935	1.020	0.888	9%	5%	33
		Cr - 50	0.558	0.528	0.537	0.541	0.558	0.528	2%	1%	19
2LJJ6	2.272	Cd - 200	0.150	0.296	0.214	0.220	0.296	0.150	8%	7%	10
		Cu - 250	0.198	0.200	0.154	0.184	0.200	0.154	2%	3%	8
		Cr - 100	0.100	0.084	0.090	0.091	0.100	0.084	1%	1%	4

Tabla 18. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a metales pesados. Se enfrentaron 5 levaduras a 3 metales: cadmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr). Las concentraciones de metales varían de acuerdo a la levadura. Para el Cd desde 100 ppm hasta 250 ppm; para el Cu desde 50 ppm hasta 250 ppm y para el Cr desde 50 ppm hasta 150 ppm.

CEPA	CONTROL	METAL - (ppm)	lectura 1	lectura 2	lectura 3	promedio	máx	mín	dmáx	dmín	% células presentes
2LJJ2	1.252	Cd - 200	0.092	0.090	0.102	0.095	0.102	0.090	1%	0%	8
		Cu - 150	0.858	0.442	0.888	0.729	0.888	0.442	16%	29%	58
		Cr - 150	0.174	0.386	0.350	0.303	0.386	0.174	8%	13%	24
4LYPO	3.176	Cd - 250	0.568	0.716	0.656	0.647	0.716	0.568	7%	8%	20
		Cu - 250	1.464	1.496	1.500	1.487	1.500	1.464	1%	2%	47
		Cr - 150	0.672	0.696	0.688	0.685	0.696	0.672	1%	1%	22
2RYP9	2.688	Cd - 200	0.292	0.299	0.303	0.298	0.303	0.292	1%	1%	11
		Cu - 50	1.156	1.240	0.932	1.109	1.240	0.932	13%	18%	41
		Cr - 100	0.338	0.372	0.374	0.361	0.374	0.338	1%	2%	13
2RMP3	0.720	Cd - 100	0.282	0.299	0.277	0.286	0.299	0.277	1%	1%	40
		Cu - 250	0.167	0.168	0.179	0.171	0.179	0.167	1%	0%	24
		Cr - 50	0.250	0.253	0.251	0.251	0.253	0.250	0%	0%	35
2LQCP4	0.992	Cd - 250	0.604	0.596	0.636	0.612	0.636	0.596	2%	2%	62
		Cu - 100	0.424	0.404	0.420	0.416	0.424	0.404	1%	1%	42
		Cr - 150	0.201	0.203	0.204	0.203	0.204	0.201	0%	0%	20
2RYP4	0.960	Cd - 100	0.282	0.210	0.230	0.241	0.299	0.277	4.31	3.19	25.1
		Cu - 150	0.130	0.138	0.132	0.133	0.179	0.167	0.49	0.35	13.9
		Cr - 50	0.232	0.242	0.239	0.238	0.253	0.250	0.45	0.59	24.8

Tabla 19. Cinética de crecimiento de la cepa 2LJJ1. La cinética de crecimiento duró 120 horas. Se realizó en medio YPG a pH 4.5 a temperatura de 28° C con una agitación de 150 RPM.

INOCULO	Dilución		Placa1	Placa2	Placa3	promedio		UFC/mL	
	30/300		98	52	72	74		7.40E+08	

DILUCIÓN	Tiempo (horas)	Placa1	Placa2	Placa3	promedio	dMIN (UFC/mL)	dMAX (UFC/mL)	UFC/mL
10⁻⁵	0	65	63	68	65.33	2333333	2666667	6.53E+07
	3	105	78	90	91.00	1300000	1400000	9.10E+07
	6	87	94	81	87.33	6333333	6666667	8.73E+07
	16	209	229	219	219.00	1000000	1000000	2.19E+08
	22	266	269	263	266.00	3000000	3000000	2.66E+08
	28	323	342	358	341.00	1800000	1700000	3.41E+08
	40	383	416	450	416.33	3333333	3366667	4.16E+08
	48	530	440	452	474.00	3400000	5600000	4.74E+08
	53	689	597	505	597.00	9200000	9200000	5.97E+08
	60	82	78	80	80.00	2000000	2000000	8.00E+08
10⁻⁶	72	148	152	150	150.00	2000000	2000000	1.50E+09
	80	240	160	230	210.00	5000000	3000000	2.10E+09
	88	238	252	223	237.67	14666667	14333333	2.38E+09
	96	252	223	237	237.33	14333333	14666667	2.37E+09
	102	212	220	216	216.00	4000000	4000000	2.16E+09
	112	102	86	121	103.00	1700000	1800000	1.03E+09
	121	119	95	70	94.67	24666667	24333333	9.47E+08

Tabla 20. Porcentaje de células viables de la levadura 2LJJ1 frente a metales pesados. Los metales que utilizaron en el ensayo fueron: Mercurio (Hg) 5 ppm y 10 ppm, cromo (Cr) 40 y 60 ppm, cobre (Cu) 60 y 80 ppm, cadmio (Cd) 40, 60, 65 y 70.

		Concentración de metales (ppm)	placa 1	placa 2	Placa 3	Promedio	Factor de dilución (10 ⁻⁶)	Factor de diseminación	UFC/mL	dx Mín	dx Máx	% células viables	
									9.20E+08				
Exposición (3 horas)	CEPA 2LJJ1	0	96	92	88	92	1000000	10	9.20E+08			100%	
	Control negativo	5	84	77	82	81	1000000	10	8.10E+08	4%	3%	88%	
		Hg	10	55	45	50	50	1000000	10	5.00E+08	5%	5%	54%
			Cr	40	44	47	47	46	1000000	10	4.60E+08	2%	1%
				60	46	42	50	46	1000000	10	4.60E+08	4%	4%
		Cu		60	53	45	49	49	1000000	10	4.90E+08	4%	4%
				80	75	60	69	68	1000000	10	6.80E+08	9%	8%
	Cd			40	88	91	88	89	1000000	10	8.90E+08	1%	2%
				60	55	54	53	54	1000000	10	5.40E+08	1%	1%
				65	45	46	47	46	1000000	10	4.60E+08	1%	1%
	70			23	25	21	23	1000000	10	2.30E+08	2%	2%	25%

Tabla 21. Genes seleccionados con mayor expresión diferencial frente a metales pesados en *Saccharomyces cerevisiae* (Cadmio 5 µM, Cadmio 25 µM, Cobre 5000 µM, Cobre 9000 µM). (Jin et al., 2008)

N°	COD. NCBI	NOMBRE SISTEMATICO	GEN	Cadmio (5 µM)		Cadmio (25 µM)		Cobre (5000 µM)		Cobre (9000 µM)	
				Δ Fold Change	P-value	Δ Fold Change	P-value	Δ Fold Change	P-value	Δ Fold Change	P-value
1	853466	YJR010W	MET3	1.26	1.87E-06	8.10	0.00E+00	4.82	0.00E+00	8.40	0.00E+00
2	853869	YKL001C	MET14	1.57	7.10E-22	7.13	0.00E+00	3.17	0.00E+00	5.16	0.00E+00
3	855660	YNL065W	AQR1	3.48	0.00E+00	5.62	0.00E+00	5.53	0.00E+00	5.53	0.00E+00
4	852343	YBR054W	YRO2	5.37	0.00E+00	5.53	0.00E+00	11.06	0.00E+00	10.53	0.00E+00
5	855789	YNR053C	NOG2	2.74	8.52E-22	3.09	0.00E+00	1.87	1.69E-21	1.02	6.61E-01
6	854981	YML027W	YOX1	3.18	9.36E-43	2.80	0.00E+00	8.37	0.00E+00	6.61	0.00E+00
7	855337	YMR292W	GOT1	2.77	0.00E+00	2.59	0.00E+00	2.47	0.00E+00	4.16	0.00E+00
8	855080	YMR058W	FET3	1.74	1.23E-13	2.30	1.11E-28	4.30	0.00E+00	4.82	0.00E+00
9	856888	YER145C	FTR1	1.42	4.95E-18	1.63	1.02E-24	2.73	6.18E-35	2.35	0.00E+00
10	851610	YDR040C	ENA1	1.46	8.70E-04	1.47	5.29E-06	1.01	9.22E-01	1.35	1.87E-02
11	855347	YMR301C	ATM1	1.31	1.00E-05	1.39	1.81E-10	1.02	4.50E-01	1.20	6.39E-09
12	850721	YLR034C	SMF3	1.18	4.33E-13	1.19	2.43E-34	1.18	1.93E-06	1.32	0.00E+00
13	850614	YFR053C	HXK1	-3.22	1.43E-28	-2.74	2.45E-29	1.04	3.80E-01	1.31	3.00E-05
14	856289	YPR160W	GPH1	-3.24	0.00E+00	-2.98	0.00E+00	1.56	2.07E-29	1.61	2.90E-16
15	851944	YDR343C	HXT6	-3.84	0.00E+00	-4.27	0.00E+00	-1.24	2.32E-25	-1.23	7.07E-11
16	853209	YGR292W	MAL12	-4.20	0.00E+00	-4.77	0.00E+00	-3.24	0.00E+00	-4.31	8.38E-34
17	852637	YGL255W	ZRT1	-3.17	0.00E+00	-9.37	0.00E+00	-4.02	0.00E+00	-8.59	0.00E+00

Tabla 22. Secuencias utilizadas para el diseño de cebadores. Organismo, número de exones, cromosoma, código de acceso de secuencias aminoacídicas y nucleotídicas; consenso aminoacídico y nucleotídico.

GEN	Organismos	# Exones	Cromosoma	Código de acceso (Aminoácidos)	Código de acceso (Nucleótido)	Consenso de aminoácidos	Consenso de nucleótidos
CYS4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	1	-	NP_011671	NM_001181284	48%	47%
	<i>Candida albicans</i> SC5314	1	-	XP_712961	XM_707868		
	<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054	1	-	XP_001383389	XM_001383352		
	<i>Rhodotorula graminis</i>	9	-	XP_018272210	XM_018413228		
	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	8	-	XP_006461900	XM_006461837		
GPH1	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> H99	9	1	XP_012046376.1	XM_012190986.1	52%	39%
	<i>Sugiyamaella lignohabitans</i>	1	D	XP_018736673.1	XM_018882280.1		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	1	-	NP_015486	NM_001184257		
	<i>Komagataella phaffii</i> GS 115	1	-	XP_002491060	XM_002491015		
	<i>Candida albicans</i> SC5314	1	-	XP_720315	XM_715222		
	<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054	1	-	XP_001384991	XM_001384954		
	<i>Trichoderma reesei</i> QM6a	8	-	XP_006962402	XM_006962340		
	<i>Sugiyamaella lignohabitans</i>	1	-	XP_018735267	XM_018877912		
	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293j	8	-	XP_752662	XM_747569		
	<i>Rhodotorula graminis</i> WP1	12	-	XP_018268254	XM_018418748		
HXK1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	1	-	NP_116711	NM_001180018	19%	12%
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h	1	-	NP_592948	NM_001018349		
	<i>Candida albicans</i> SC5314	1	-	XP_712429	XM_707336		
	<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054	1	-	XP_001386689	XM_001386652		
	<i>Trichoderma reesei</i> QM6a	6	-	XP_006961576	XM_006961514		
	<i>Schizophyllum commune</i> H4-8	17	-	XP_003034596	XM_003034550		
	<i>Rhodotorula toruloides</i> NP11	13	-	XP_016275187	XM_016419733		
	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i> H97	14	-	XP_006455144	XM_006455081		
NOG2	<i>Sugiyamaella lignohabitans</i>	1	-	XP_018737257	XM_018879329	27%	20%
	<i>Candida albicans</i> SC5314	2	-	XP_019331013	XM_019475468		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	2	-	NP_014451	NM_001183230		
	<i>Malassezia pachydermatis</i>	2	-	XP_017992367	XM_018135144		
NOG2	<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7130	9	-	XP_001829438	XM_001829386	27%	20%
	<i>Moniliophthora roreri</i> MCA 2997	8	-	XP_007847256	XM_007849065		
	<i>Rhodotorula graminis</i> WP1	7	-	XP_018273637	XM_018415830		

GEN	Organismos	# Exones	Cromosoma	Código de acceso (Aminoácidos)	Código de acceso (Nucleótido)	Consenso de aminoácidos	Consenso de nucleótidos
YRO2	<i>Ustilago maydis</i> 521	1	-	XP_01139026	XM_011390724	25%	33%
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	1	-	NP_009610	NM_001178402		
	<i>Naumovozyma dairenensis</i> CBS	1	-	XP_003668135	XM_003668087		
	<i>Candida glabrata</i> CBS 138	1	-	XP_447235	XM_447235		
	<i>Tetrapispora phaffii</i> CBS	1	-	XP_003683916	XM_003683868		
ACE2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	1	7	NP_013232	NM_001182018	45%	37%
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ATCC 6260	1	-	XP_001484096	XM_001484046		
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h-	1	-	NP_594109	NM_001019533		
	<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054	3 8	-	XP_001386274	XM_001386237		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	1	-	NP_014334	NM_001182903		
AQR1	<i>Candida glabrata</i> CBS 138	1	-	XP_448142	XM_448142	24%	26%
	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	1	-	XP_003680559	XM_003680511		
	<i>Naumovozyma castellii</i> CBS 4309	1	-	XP_003677538	XM_003677490		
	<i>Kazachstania africana</i> CBS 2517	1	10	XP_003959296	XM_003959247		
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ATC 6260	1	Hypothetical protein	XP_001486958.1	XM_001486908.1		
ATM1	<i>Rhodotorula toruloides</i> NP11	1	Hypothetical protein	XP_016275553	XM_016418277	62%	45%
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	1	13	NP_014030	NM_001182810		
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ATCC 6260	1	Hypothetical protein	XP_001485445	XM_001485395		
	<i>Rhodotorula toruloides</i> NP11	1	Hypothetical protein	XP_001485445	XM_016416070		
	<i>Candida albicans</i> SC5314	1	6	XP_712090	XM_706997		
ENA1	<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054	1	3	XP_001383432	XM_001383395	36%	27%
	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	2	7	XP_001819593	XM_001819541		
	<i>Pseudozyma huberensis</i> SY62	1	-	XP_012192928.1	XM_012337538.1		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	1	4	NP_010325	NM_001180348		
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ATCC 6260	1	hypothetical protein	XP_001484999	XM_001484949		
HXT6	<i>Pichia membranifaciens</i> NRRL Y-2026	1	hypothetical protein	XP_019015284	XM_019161998	18%	18%
	<i>Neurospora crassa</i> OR74A	3	6	XP_956354	XM_951261		
	<i>Rhodotorula toruloides</i> NP11	9	unknown	XP_016271189	XM_016417537		
	<i>Spathaspora passalidarum</i> NRRL Y-27907	1	unknown	XP_007377683	XM_007377621		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	1	4	NP_010630	NM_001180651		
HXT6	<i>Rhodotorula toruloides</i>	unknown	unknown	CDR40797.1	LK052940.1	18%	18%
	<i>Candida tropicalis</i> MYA-3404	1	-	XP_002546860	XM_002546814		
	<i>Sugiyamaella lignohabitans</i>	1	B	XP_018737048	XM_018879100		

GEN	Organismos	# Exones	Cromosoma	Código de acceso (Aminoácidos)	Código de acceso (Nucleótido)	Consenso de aminoácidos	Consenso de nucleótidos
	<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>	1	-	XP_011276874	XM_011278572		
	<i>Kalmanozyma brasiliensis</i>	1	unknown	XP_016289658.1	XM_016439326.1		
	<i>Pseudozyma antarctica</i>	1	unknown	XP_014656637.1	XM_014801151.1		
PRC1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h	1	1	NP_593552	NM_001018985		
	<i>Schizosaccharomyces cryophilus</i> OY26	1	Unknown	XP_013022696.1	XM_013167242.1		
	<i>Rhodotorula graminis</i> WP1	6	unknown	XP_018289364	XM_018417655.1		
	<i>Saitoella complicata</i> NRRL Y-17804	2	unknown	XP_019023924	XM_019171223.1		
	<i>Rhodotorula toruloides</i> NP11	6	unknown	XP_016274386.1	XM_016421265.1		
	<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>Tritici</i> CRL 75-36-700-3	1	-	XP_003321784	XM_003321736.2		
ZRT1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	1	7	NP_011259	NM_001181121.1		
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h-	1	2	NP_596501	NM_001022422.2		
	<i>Sugiyamaella lignohabitans</i>	1	B	XP_018737299	XM_018879377.1		
	<i>Eremothecium sinicaudum</i>	1	2	XP_017986013	XM_018130524.1		
	<i>Lachancea thermotolerans</i> CBS 6340	1	C	XP_002552244	XM_002552198.1		
	<i>Penicillium rubens</i> Wisconsin 54-1255	1	C	XP_002557185	XM_002557139.1		
GOT1	<i>Candida glabrata</i> CBS 138	1	M	XP_449534	XM_449534.1		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	2	13	NP_014020	NM_001182800.1		
	<i>Neurospora crassa</i> OR74A	4	4	XP_962234	XM_957141.2		
	<i>Beauveria bassiana</i> ARSEF 2860	5	unknown	XP_008593811	XM_008595589.1		
	<i>Cordyceps militaris</i> CM01	5	Unknown	XP_006669468	XM_006669405.1		
	<i>Aspergillus fischeri</i> NRRL 181	5	Unknown	XP_001262505	XM_001262504.1		
FET3	<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054	2	2	XP_001382934	XM_001382897.1		
	<i>Verticillium dahliae</i> VdLs.17	5	5	XP_009655036	XM_009656741.1		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	1	13	NP_013774	NP_013774.1		
	<i>Sugiyamaella lignohabitans</i>	1	A	XP_018734886	XM_018882615.1		
	<i>Spathaspora passalidarum</i> NRRL Y-27907	1	Unknown	XP_007377258	XM_007377196.1		
	<i>Candida albicans</i> SC5314	1	6	XP_711265	XM_706173.2		
	<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054	2	7	XP_001386173	XM_001386136.1		
	<i>Trichoderma reesei</i> QM6a	2	Unknown	XP_006967766	XM_006967704.1		
	<i>Pseudozyma huberensis</i> SY62	2	Unknown	XP_012190259	XM_012334869.1		
	<i>[Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> CRL 75-36-700-3	12	Unknown	XP_003331095	XM_003331047.2		
	<i>Phanerochaete carmosa</i> HHB-10118-sp	6	Unknown	XP_007394372	XM_007394310.1		
	<i>Stereum hirsutum</i> FP-91666 SS1	11	Unknown	XP_007308963	XM_007308901.1		

GEN	Organismos	# Exones	Cromosoma	Código de acceso (Aminoácidos)	Código de acceso (Nucleótido)	Consenso de aminoácidos	Consenso de nucleótidos
	<i>Postia placenta Mad-698-R</i>	11	Unknown	XP_002469890	XP_007308963.1		
	<i>Trametes versicolor FP-101664 SS1</i>	10	Unknown	XP_008041332	XM_008043141.1		
	<i>Heterobasidion irregulare TC 32-1</i>	10	Unknown	XP_009551882	XM_009553587.1		
	<i>Agaricus bisporus var. bisporus H97</i>	10	Unknown	XP_006463847	XM_006463784.1		
MET3	<i>Saccharomyces cerevisiae S288c</i>	1	11	NP_012925.3	NM_001179567.3		
	<i>Meyerozyma guilliermondii ATCC 6260</i>	1	hypothetical protein	XP_001483128.1	XM_001483078		
	<i>Candida tanzawaensis NRRL Y-17324</i>	1	Unknown	XP_020063429.1	XM_020211730		
	<i>Milleromyza farinosa CBS 7064</i>	1	B	XP_004204430.1	XM_004204382		
	<i>Pseudozyma hubeiensis SY62</i>	1	-	XP_012189307.1	XM_012333917		
	<i>Rhodotorula toruloides NP11</i>	5	Unknown	XP_016270526.1	XM_016418074		
	<i>Cryptococcus gattii WM276</i>	5	H	XP_003195863.1	XM_003195815		
	<i>Saccharomyces cerevisiae S288c</i>	5	Unknown	NP_012925.3	NM_001179567		
MET14	<i>Meyerozyma guilliermondii ATCC 6260</i>	1	-	XP_001483975.1	XM_001483925		
	<i>Pseudozyma hubeiensis SY62</i>	1	-	XP_012189804.1	XM_012334414		
	<i>Candida orthopsilosis Co 90-125</i>	1	5	XP_003870339.1	XM_003870290		
	<i>Tetrapispora blattae CBS 6284</i>	1	2	XP_004178891.1	XM_004178843		
	<i>Cryptococcus gattii WM276</i>	4	E	XP_003194375.1	XM_003194327		
	<i>Laccaria bicolor S238N-H82</i>	7	-	XP_001877690.1	XM_001877655.1		
	<i>Pseudozyma flocculosa PF-1</i>	2	Unknown	XP_007878070.1	XM_007879879.1		
	<i>Agaricus bisporus var. bisporus H97</i>	5	Unknown	XP_006461029.1	XM_006460966.1		
SMF3	<i>Saccharomyces cerevisiae S288c</i>	1	12	NP_013134.1	NM_001181921.2		
	<i>Punctularia strigosozonata HHB-11173 SS5</i>	8	Unknown	XP_007379246.1	XM_007379184.1		
	<i>Heterobasidion irregulare TC 32-1</i>	11	Unknown	XP_009540344.1	XM_009542049.1		
	<i>Laccaria bicolor S238N-H82</i>	14	-	XP_001873566.1	XM_001873531.1		
	<i>Kluyveromyces lactis NRRL Y-1140</i>	1	F	XP_455861.1	XM_455861.1		
	<i>Candida glabrata CBS 138</i>	1	A	XP_444919.1	XM_444919.1		
	<i>Kazachstaniana africana CBS 2517</i>	1	6	XP_003957994.1	XM_003957945.1		
	<i>Naumovozyma dairenensis CBS 421</i>	1	5	XP_003670240.1	XM_003670192.1		
YOX1	<i>Saccharomyces cerevisiae S288c Yox1p</i>	1	13	NP_013685.1	NM_001182385.1		
	<i>Schizosaccharomyces pombe 972h- MBF</i>	1	2	NP_595674.1	NM_001021569.2		
	<i>Sugiyamaella lignohabitans Yox1p</i>	1	A	XP_018735605.1	XM_018878286.1		
	<i>Candida albicans SC5314 Yox1p</i>	1	7	XP_720311.1	XM_715218.1		
	<i>Scheffersomyces stipitis CBS 6054</i>	3	5	XP_001385298.2	XM_001385261.1		

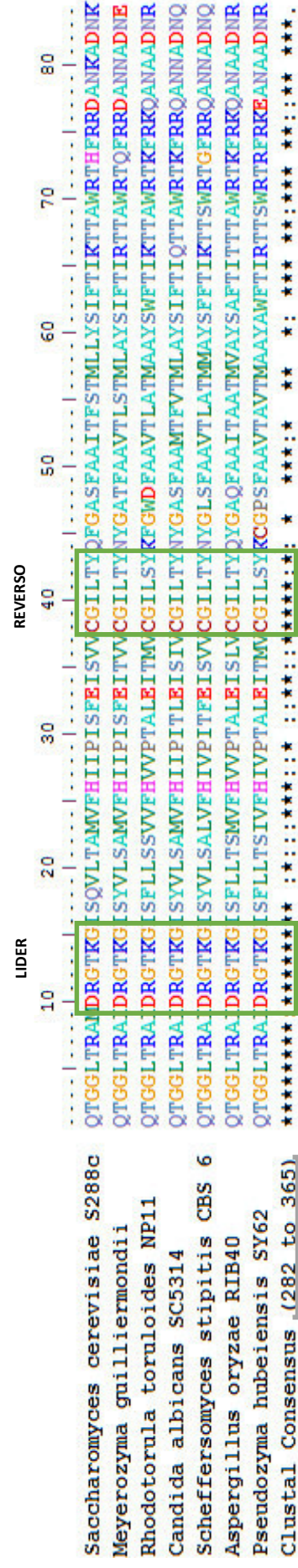
GEN	Organismos	# Exones	Cromosoma	Código de acceso (Aminoácidos)	Código de acceso (Nucleótido)	Consenso de aminoácidos	Consenso de nucleótidos
FTR1	<i>Spathaspora passalidarum</i> NRRL Y-27907	2	Unknown	XP_007377909.1	XM_007377847.1		
	<i>Saccharomyces eubayanus</i> YOX1	1	13	XP_018220039.1	XM_018367105.1		
	<i>Ashbya gossypii</i> ATCC 10895 AER314Wp	1	5	NP_985170.1	NM_210524.1		
	<i>Yarrowia lipolytica</i> YAL10E20449p	1	E	XP_504187.1	XM_504187.1		
	<i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767 DEHA2F22286p	1	F	XP_461312.2	XM_461312.1		
	<i>Lachancea thermotolerans</i> CBS 6340 KL TH0G04686p	1	G	XP_002555241.1	XM_002555195.1		
	<i>Candida dubliniensis</i> CD36	1	7	XP_002421310.1	XM_002421265.1		
	<i>Candida glabrata</i> CBS 138	1	G	XP_446676.1	XM_446676.1		
	<i>Kazachstania africana</i> CBS 2517	1	3	XP_003956686.1	XM_003956637.1		
	<i>Walleria ichthyophaga</i> EXF-994	2	Unknown	XP_009265855.1	XM_009267580.1		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	1	5	NP_011072.1	NM_001179035.1		
	<i>Candida albicans</i> SC5314	1	1	XP_715020.1	XM_709927.1		
	<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054	1	6	XP_001385519.2	XM_001385482.1		
	<i>Sugiyamaella lignohabitans</i>	1	A	XP_018734888.1	XM_018882617.1		
	<i>Metarhizium robertsii</i> ARSEF 23	4	-	XP_007825037.1	XM_007826846.1		
	<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	4	-	XP_001225870.1	XM_001225869.1		
MAL12	<i>Pestalotiopsis fici</i> W106-1	4	Unknown	XP_007835912.1	XM_007837721.1		
	<i>Exophiala spinifera</i>	1	Unknown	XP_016233693.1	XM_016382990.1		
	<i>Bipolaris victorinae</i> Fl3	5	Unknown	XP_014558999.1	XM_014703513.1		
	<i>Fusarium graminearum</i> PH-1	4	3	XP_011323664.1	XM_011325362.1		
	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	1	-	XP_001397080.1	XM_001397043.1		
	<i>Verticillium albo-atrum</i> VaMs.102	4	Unknown	XP_003005515.1	XM_003005469.1		
	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>burnettii</i> JB137-S8	10	Unknown	XP_007333502.1	XM_007333440.1		
	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> B-3501A	8	13	XP_772070.1	XM_766977.1		
	<i>Rhodotorula toruloides</i> NP11	12	Unknown	XP_016276839.1	XM_016413832.1		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	1	7	NP_011808.3	NM_001181421.3		
CYS4	<i>Saccharomyces eubayanus</i>	1	5	XP_018222851.1	XM_018364779.1		
	<i>Pseudozyma hubeiensis</i> SY62	1	-	XP_012187963.1	XM_012332573.1		
	<i>Rhodotorula toruloides</i> NP11	7	Unknown	XP_016276920.1	XM_016413913.1		
	<i>Moesziomyces antarcticus</i>	1	Unknown	XP_014655677.1	XM_014800191.1		
	<i>Ustilago maydis</i>	2	20	XP_011392360.1	XM_011394058.1		
	<i>Kalmanozyma brasiliensis</i>	1	Unknown	XP_016289852.1	XM_016439491.1		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	1	7	NP_011671.3	NM_001181284		
						52%	47%

GEN	Organismos	# Exones	Cromosoma	Código de acceso (Aminoácidos)	Código de acceso (Nucleótido)	Consenso de aminoácidos	Consenso de nucleótidos
	<i>Candida albicans</i> SC5314	1	1	XP_712961.1	XM_707868.2		
	<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054	1	3	XP_001383389.1	XM_001383352.1		
	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> H99	9	1	XP_012046376.1	XM_012190986.1		
	<i>Sugiyamaella lignohabitans</i>	1	D	XP_018736673.1	XM_018882280.1		
	<i>Rhodotorula graminis</i> WP1	9	Unknown	XP_018272210.1	XM_018413228.1		
	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i> H97	8	Unknown	XP_006461900.1	XM_006461837.1		
	<i>Saitoella complicata</i> NRRL Y-17804	2	Unknown	XM_019171223.1	XP_019023924.1		
	<i>Rhodotorula graminis</i> WP1	6	Unknown	XM_018417655.1	XP_018269364.1		
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1	1	NM_001018985.2	NP_593552.1		
	<i>Schizosaccharomyces cryophilus</i> OY26	1	Unknown	XP_013022696.1	XM_013167242.1		
PRC1	<i>Rhodotorula toruloides</i> NP11	6	Unknown	XP_016274386.1	XM_016421265.1		
	<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> CRL 75-36-700-3	1	-	XP_003321784.1	XM_003321736.2		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	2	6		NM_001179927.1		
	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i> DSM 70294	2	-		XM_001645286.1		
ACT1	<i>Pichia membranifaciens</i> NRRL Y-2026	3	Unknown		XM_019160889.1		
	<i>Meyeromyces guilliermondii</i> ATCC 6260	1	-		XM_001482530.1		
	<i>Penicillium digitatum</i> Pd1	6	Unknown		XM_014682025.1		
	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	9	-		XM_003188864.1		
	<i>Trichoderma atroviride</i> IMI 206040	7	Unknown		XM_014093394.1		
	<i>Candida glabrata</i> CBS 138	2	K		XM_448768.2		
	<i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y-1140	2	D		XM_453299.1		
				-		-	99%
						37%	27%

Paso 1

REGIÓN CONSERVADA EN AMINOÁCIDOS (aa)

Paso 2



Paso 3

% Consenso de aminoácidos: 58%

Figura 36. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del gen ATM1. Se realizó la extracción a partir de la posición 282 a 365; para el diseño cebadores por consenso degenerado de hibridación oligonucleótidos (CODEHOP). Porcentaje de consenso según el alineamiento para el gen ATM1. Alineamiento realizado y obtenido del programa Bioedit 2.0.

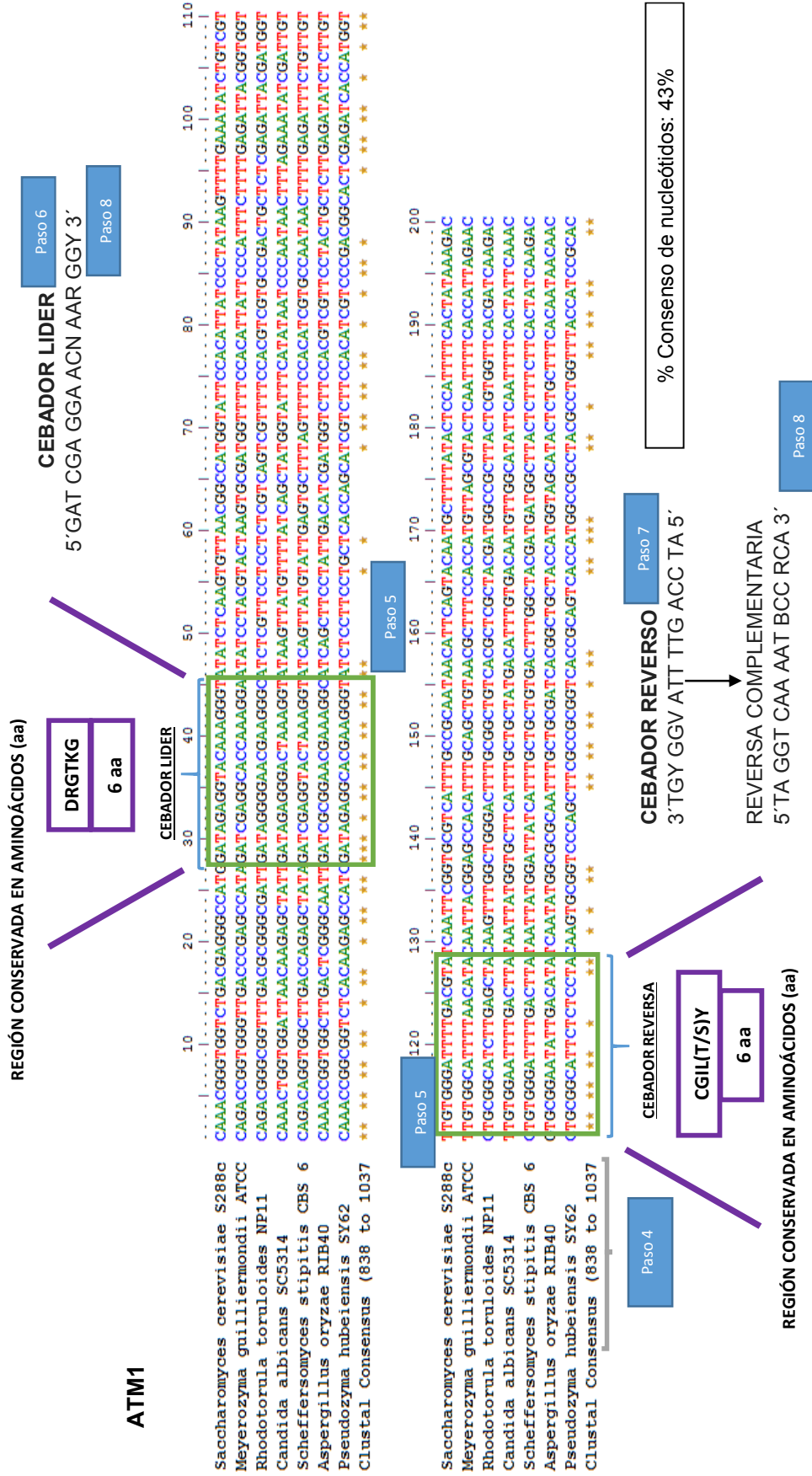


Figura 37. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen ATM1. Se realizó la extracción a partir de la posición 838 a la 1037, se diseñó los cebadores por consenso degenerado de hibridación oligonucleótidos (CODEHOP). Se determinó el porcentaje de consenso según el alineamiento para el gen ATM1. Alineamiento realizado y obtenido del programa Bioedit 2.0.

CYS4

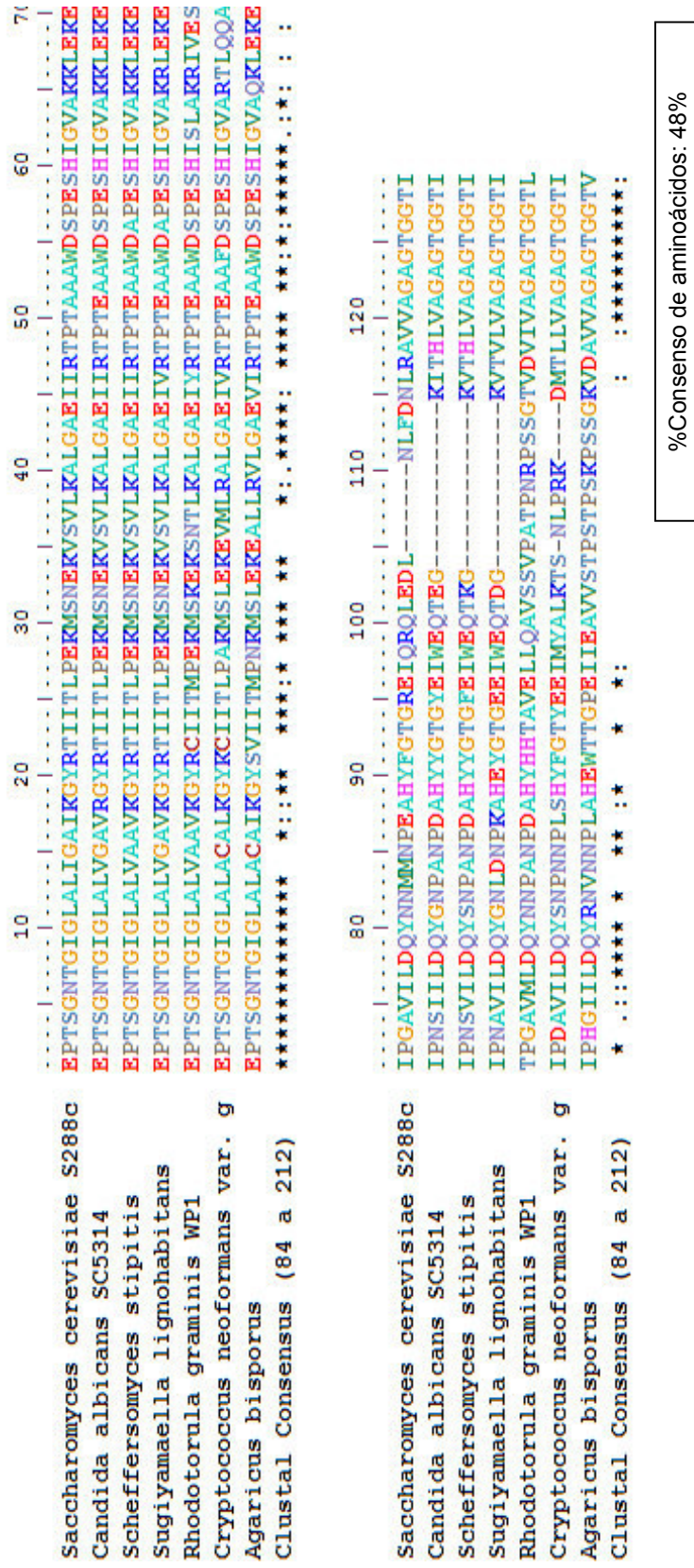


Figura 38. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del gen CYS4. Se realizó la extracción a partir de la posición 84 a 212; para el diseño cebadores por consenso degenerado de hibridación oligonucleótidos (CODEHOP). Porcentaje de consenso según el alineamiento para el gen CYS4. Alineamiento realizado y obtenido del programa Bioedit 2.0.

CYS4

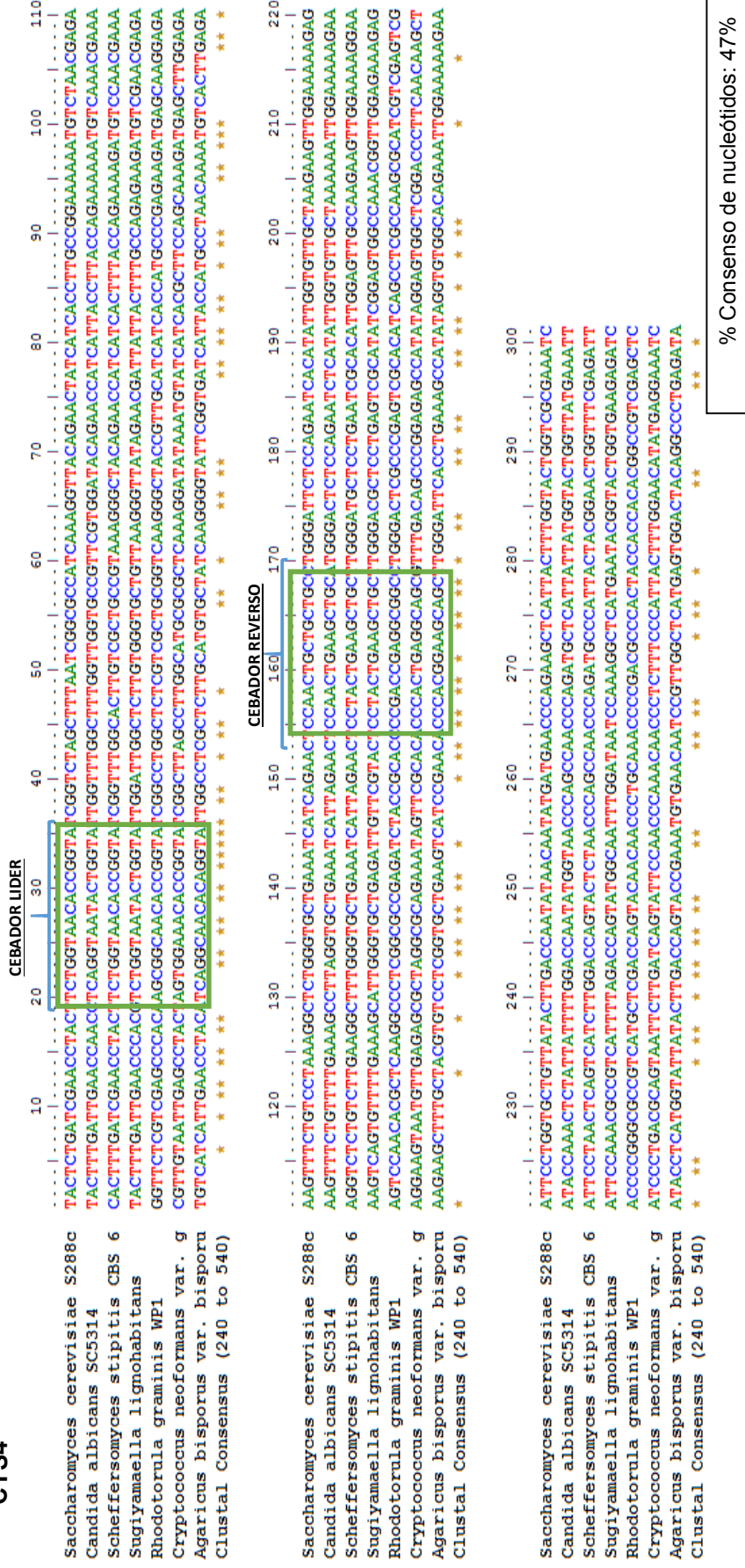


Figura 39. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen CYS4. Se realizó la extracción a partir de la posición 240 a la 540, se diseñó los cebadores por consenso degenerado de hibridación oligonucleótidos (CODEHOP). Se determinó el porcentaje de consenso según el alineamiento para el gen CYS4. Alineamiento realizado y obtenido del programa Bioedit 2.0.

GPH1

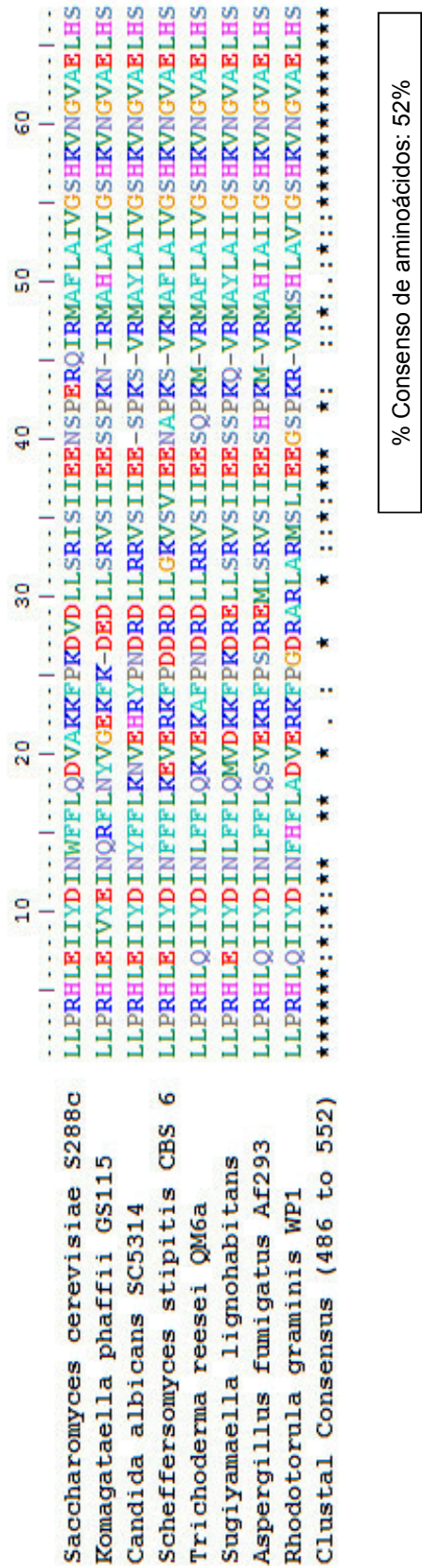


Figura 40. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del gen GPH1. Se realizó la extracción a partir de la posición 486 a 552; para el diseño cebadores por consenso degenerado de hibridación oligonucleótidos (CODEHOP). Porcentaje de consenso según el alineamiento para el gen GPH1. Alineamiento realizado y obtenido del programa Bioedit 2.0.

GPH1

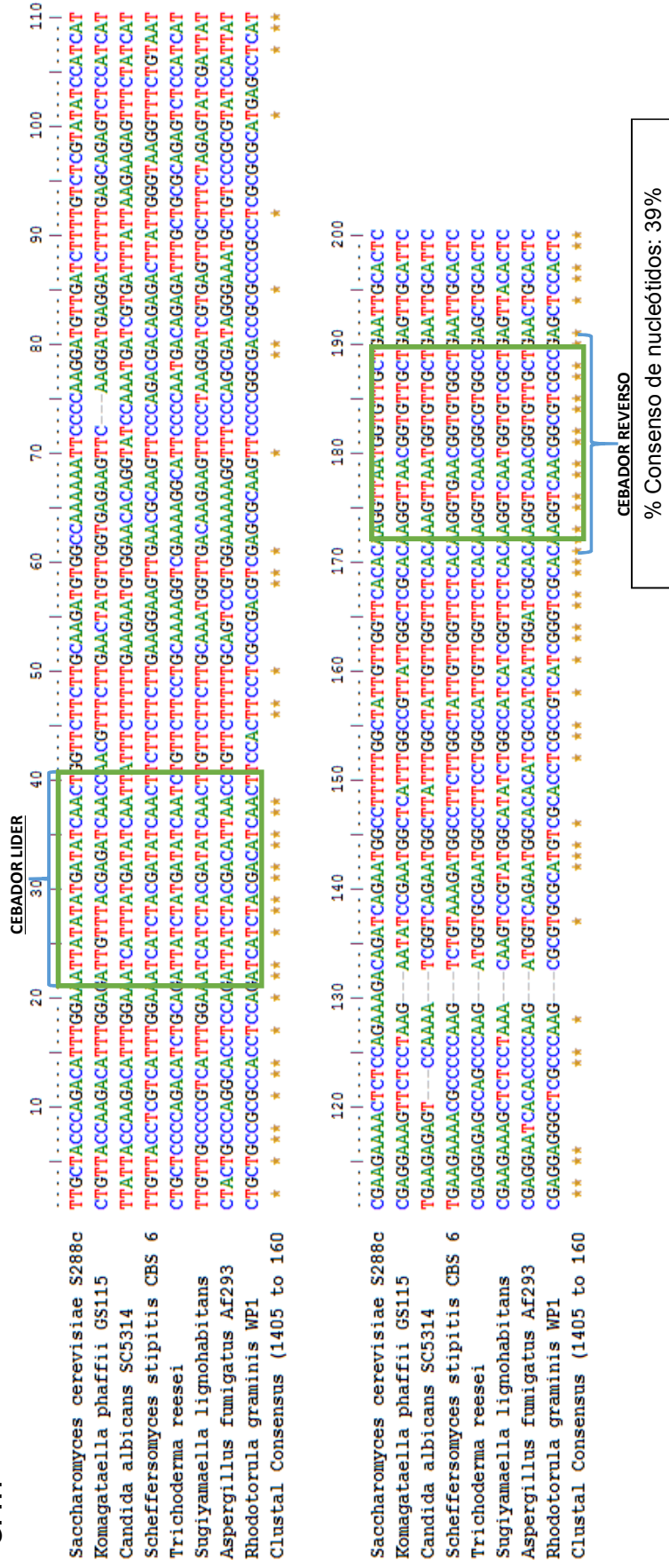


Figura 41: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen GPH1. Se realizó la extracción a partir de la posición 1405 a la 1604, se diseñó los cebadores por consenso degenerado de hibridación oligonucleótidos (CODEHOP). Se determinó el porcentaje de consenso según el alineamiento para el gen GPH1. Alineamiento realizado y obtenido del programa Bioedit 2.0.

PRC1

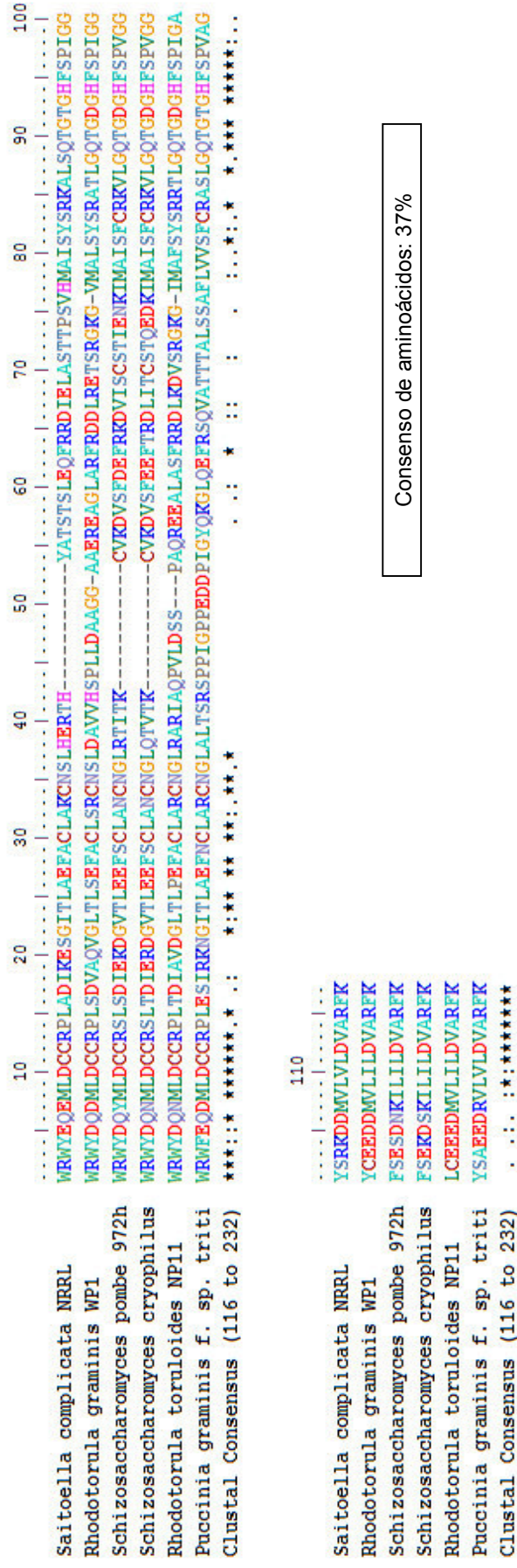


Figura 42. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del gen PRC1. Se realizó la extracción a partir de la posición 116 a 232; para el diseño cebadores por consenso degenerado de hibridación oligonucleótidos (CODEHOP). Porcentaje de consenso según el alineamiento para el gen PRC1. Alineamiento realizado y obtenido del programa Bioedit 2.0.

CEBADOR LIDER

Schizosaccharomyces pombe 972h
Schizosaccharomyces cryophilus
Rhodotorula toruloides NP11 gl
Puccinia graminis f. sp. tritici
Rhodotorula graminis WP1 hypot
Saitoella complicata NRRL Y-17
Clustal Consensus (352 to 708)

TGGCGGTGTTATGAT CAGTATACTGCTAGATTGTTGT GATCGCTAAGCGATATTGAAAGAAGCGGTGTACGCTAGAGAAGTCTTCTGTTTAGCTAACTGCAGATGGCGCT
 TGGCGGTGTTATGAT GTTCTCTTAAACCGGACATCTGCTGCAACGAGCGGAGTCTCTTGAAGAGTCTTCACTGTTAGCAAACTGCAGATGGCGCT
 TGGCGGTGTTATGAT CAAAACATGCTGCACTGCTGTTGACCGTGAAGTAAAGGAACTCACTCGCCGAAATTCGCTGCGCTCGCAAACTGCAGATGGCGCT
 TGGAGATGTTTACGA CAAAGACATGCTGGAATGTTGT GACCGCTGAGCGAATCGCCCAAGTAAAGGAACTCACTCGCCGAAATTCGCTGCGCTCGCAAACTGCAGATGGCGCT
 TGGCGGTGTTATGAT CAAAGATGTTTGAATGTTGT GCGCGCTGGCCGATATCAAGGAGAGATGGGAATTACGCTTGTGAGTGTGCTGTTGGCGAAGTGTAACTCGTT
 TGGCGGTGTTATGAT CAAAGATGTTTGAATGTTGT GCGCGCTGGCCGATATCAAGGAGAGATGGGAATTACGCTTGTGAGTGTGCTGTTGGCGAAGTGTAACTCGTT

Schizosaccharomyces pombe 972h
Schizosaccharomyces cryophilus
Rhodotorula toruloides NP11 gl
Puccinia graminis f. sp. tritici
Rhodotorula graminis WP1 hypot
Saitoella complicata NRRL Y-17
Clustal Consensus (352 to 708)

TCGGAC - TATTACGAAATGTCGAAAGTGTAG 120
 CCAAC - TATTGACGAAATGTCGAAAGCTTC 121
 CGGACGACGATCGCGAGGATGCTTCGAGTGTC 122
 CGCTTAACGACGATCGCGAGGATGCTTCGAGTGTC 123
 CGGCGCTGCTGCGACTCGCGCTTCGAGCAGCAGG 124
 CATGA - GAGGACGCAATTATCTACTTCGACGAG 125
 126
 127
 128
 129
 CTTTGATGAATTTGCGAAG 130
 CTTTGAAGAGTGCACAGAG 131
 GCGTCGACGCGGCAAGAGCGCTCGCAGCTTACGAC 132
 GCGCTATTAGATATCAAAAGAGTTACGACGCGCTCTAT 133
 CGGCTGCGCGGCGAGCGGCGCTCGCGCGGTTTCGAC 134
 TTTGGACGACGTTTAGGAGG 135
 136
 137
 138
 139
 ACGTAATCTCTT 140
 ACCTTTACACT 141
 GTCCTA 142
 143
 144
 145
 146
 147
 148
 149
 150
 151
 152
 153
 154
 155
 156
 157
 158
 159
 160
 161
 162
 163
 164
 165
 166
 167
 168
 169
 170
 171
 172
 173
 174
 175
 176
 177
 178
 179
 180
 181
 182
 183
 184
 185
 186
 187
 188
 189
 190
 191
 192
 193
 194
 195
 196
 197
 198
 199
 200
 201
 202
 203
 204
 205
 206
 207
 208
 209
 210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221
 222
 223
 224
 225
 226
 227
 228
 229
 230
 231
 232
 233
 234
 235
 236
 237
 238
 239
 240
 241
 242
 243
 244
 245
 246
 247
 248
 249
 250
 251
 252
 253
 254
 255
 256
 257
 258
 259
 260
 261
 262
 263
 264
 265
 266
 267
 268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277
 278
 279
 280
 281
 282
 283
 284
 285
 286
 287
 288
 289
 290
 291
 292
 293
 294
 295
 296
 297
 298
 299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306
 307
 308
 309
 310
 311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369
 370
 371
 372
 373
 374
 375
 376
 377
 378
 379
 380
 381
 382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432
 433
 434
 435
 436
 437
 438
 439
 440
 441
 442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450
 451
 452
 453
 454
 455
 456
 457
 458
 459
 460
 461
 462
 463
 464
 465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472
 473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483
 484
 485
 486
 487
 488
 489
 490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502
 503
 504
 505
 506
 507
 508
 509
 510
 511
 512
 513
 514
 515
 516
 517
 518
 519
 520
 521
 522
 523
 524
 525
 526
 527
 528
 529
 530
 531
 532
 533
 534
 535
 536
 537
 538
 539
 540
 541
 542
 543
 544
 545
 546
 547
 548
 549

Schizosaccharomyces pombe 972h
Schizosaccharomyces cryophilus
Rhodotorula toruloides NP11 gl
Puccinia graminis f. sp. tritici
Rhodotorula graminis WP1 hypot
Saioella complicata NRRL Y-17
Clustal Consensus (352 to 708)

AGAAATAAAATATGGCAATTTTCATTTTCCGGGAAAGTGCCTGGTCAAAACAGCGCATTTTGTAGTCCAGTTGGGCGCTTCAGTGAAAAGTGTAACAAGATATAATAATA
GAAACAGAGATCATGGCAATTTCTGTCTGCGGTAAAGATCTTAGGACAAATCAGAGACAAATCAGAGACGATCATTTAGTCAGTCTGTTGGAGGCTTTAGTGAAAAGAGACAGCAAAATCTCGAT
GAAAAGGGAGATCATGGCTTTCTGTATCGGAGGAAATCTTTGGGCAACATGAGACAGATCATTTAGCGCCATCTCGAGACGCTGTGAAAAGAGAGATATGGTGTGTGAT
TTCCGGCTTTCTAGTGTATCTGCGGTGCGAGTCTTAGTCCAGACCGGGCATCTTTAGCGGATTTGGTCTCTACGCGAGAGAGACAGCGGTGGCTAGTT
GCAAGGGCTCATGGCGCTCAGCTATCTGCGGAGCTGGCCGACAGCGGCACTTTAGCCGCTATCGCGGATCTGCGGAGAGAGACAGCGGTGGCTAGTT
CATCGGTGCATATGGCTATCTGTATTCGAGGAAAGGCATCTCTCAAAATCGCACGGGSCCATTTCTCGCCCAATAGTGTTACTTCCCGGAAAGATGACATGGTTCCTCGTA

Schizosaccharomyces pombe 972h
Schizosaccharomyces cryophilus
Rhodotorula toruloides NP11 gl
Puccinia graminis f. sp. tritici
Rhodotorula graminis WP1 hypot
Saitoella complicata NRRL Y-17
Clustal Consensus (352 to 708)

CEBADOR REVERSO

340 350

TTT GAGCTTGCTCGATTTAAA PATCCT
TTT GAGCTTGCGAGCTTCAAAATATCCT
CTT GAGCTTGCGCGCTTCAAGTACCT
TTT GAGCTGCGGAGATTTAAAATATCCT
CTT GAGCTTGCGCGCTTCAAGTACCT
CTT GAGCTGCGAGGTTCAAGTACCT

Consenso de nucleótidos: 27%

Figura 43. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen PRC1. Se realizó la extracción a partir de la posición 352 a la 708, se diseñó los cebadores por consenso degenerado de hibridación oligonucleótidos (CODEHOP). Se determinó el porcentaje de consenso según el alineamiento para el gen PRC1. Alineamiento realizado y obtenido del programa Bioedit 2.0.

Saccharomyces cerevisiae S288C
Meyerozyma guilliermondii ATCC
Pichia membranifaciens NRRL Y-
Neurospora crassa OR74A
Rhodotorula toruloides NP11
Spathaspora passalidarum NRRL
Clustal Consensus (175 to 208)

```
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
KVGD TIPADLR LIETKNFDTDESLLTGESLPVSK
KVGDTVPA DLR LIESMNLEADEALLTGESLPVQK
KVGDTIPADLR LIETHNFETDEALLTGESLPVAK
KMGD TLPADIR LIEAKNFE TDEALLTGESLPVRK
KTGDTIPADLR LIVETVNFETDEALLTGESLPVAK
NAGD TIPADLR LIDSKNLETDEALLTGESLPVAK
: ***:***:***::*:***:*****
```

% Consenso de aminoácidos: 62%

% Consenso de aminoácidos: 62%

[illegible]

119

[illegible]

120

ACE2

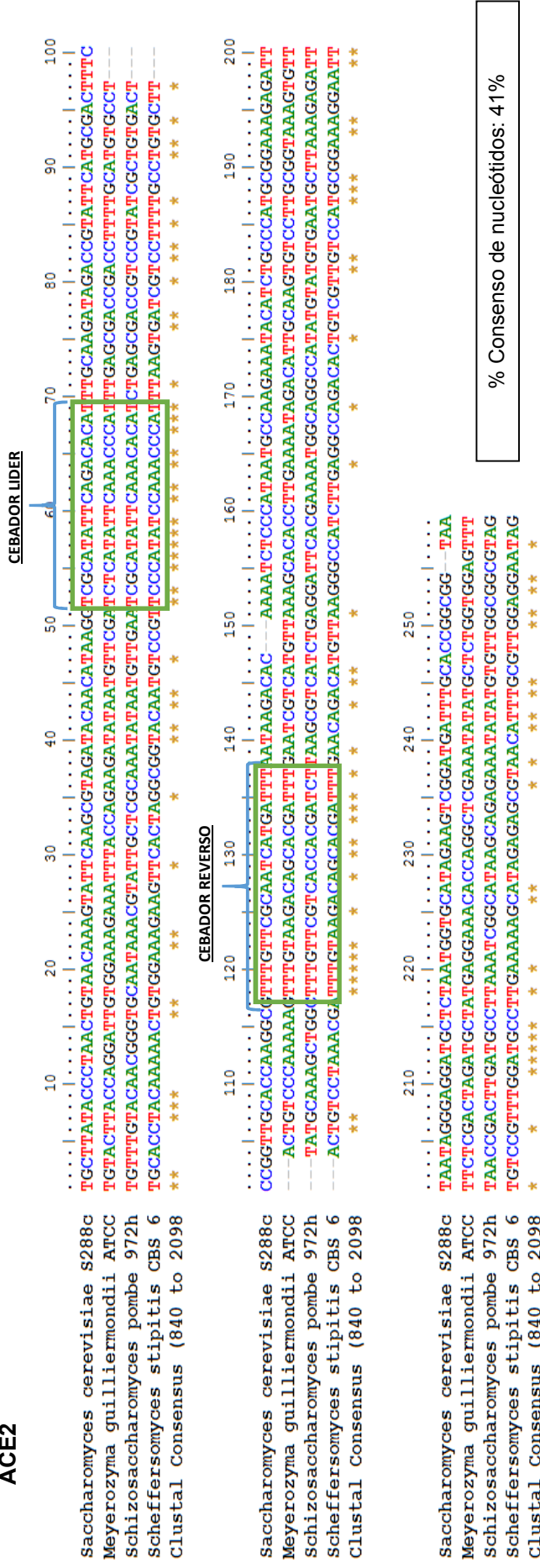


Figura 47. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen ACE2. Se realizó la extracción a partir de la posición 840 a la 2098, se diseñó los cebadores por consenso degenerado de hibridación oligonucleótidos (CODEHOP). Se determinó el porcentaje de consenso según el alineamiento para el gen ACE2. Alineamiento realizado y obtenido del programa Bioedit 2.0.

CEBADOR LIDER

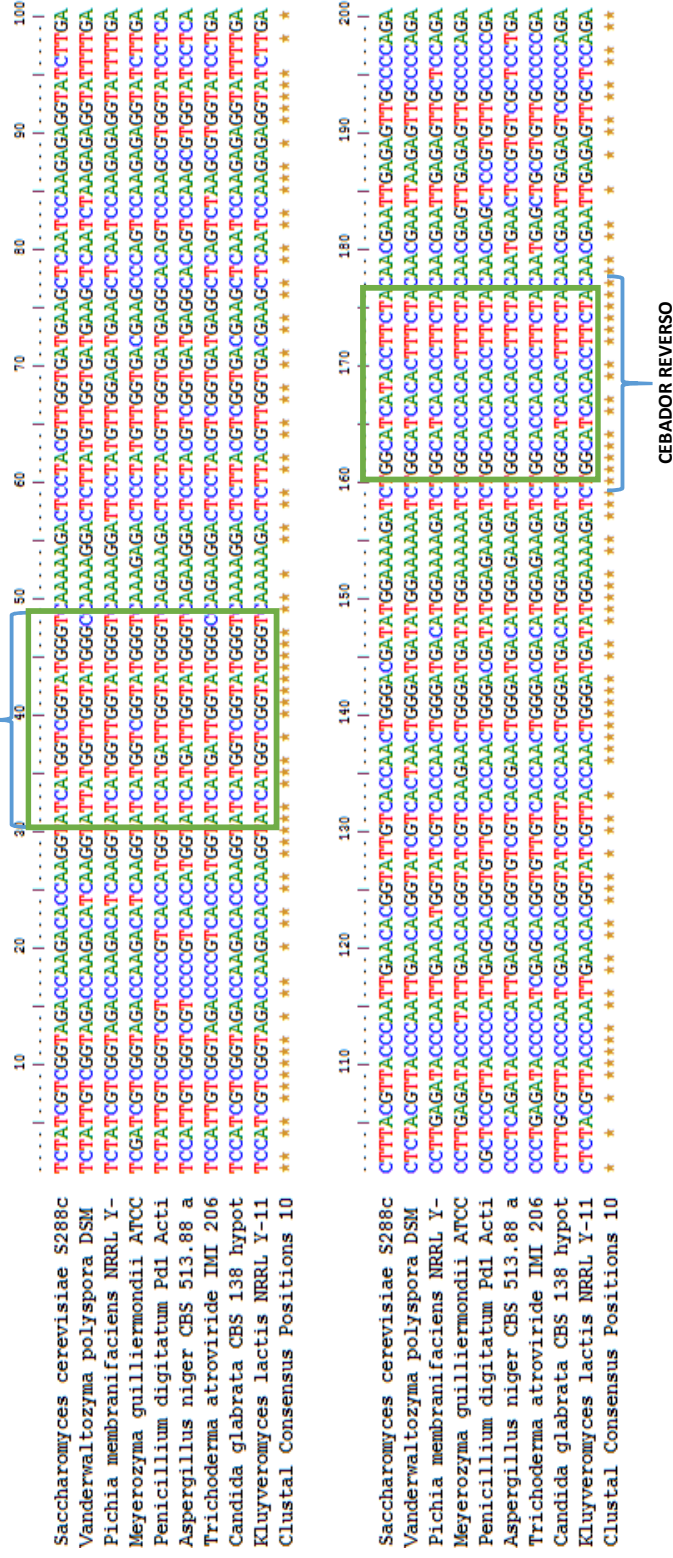


Figura 48. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen ACT. Se realizó la extracción a partir de la posición 100 a 300; para el diseño cebadores del gen beta actina como control endógeno.

Tabla 23. Análisis de los parámetros fisicoquímicos de los cebadores. El análisis se realizó en la web: Oligoanalyzer integrated DNA technologies (IDTNA).

GEN	CEBADOR	%CG	HAIRPIN (KCAL/MOL)	HOMODIMERO (KCAL/MOL)	HETERODÍMEROS
ATM1_F	GAT CGA GGA ACN AAR GGY AT	47.5	1.54	-6.76	-8.32
ATM1_R	TA GGT CAA AAT BCC RCA RAC	43.3	2.28	-5.24	
GPH1_F	G CAG ATC ATC TAY GAY ATC AA	38.1	-1.94	-12.23	-5.47
GPH1_R	T AGC AAC ACC RTT RAC CTT GTG	45.5	0.14	-7.91	
CYS4_F	GGT AAC ACC GGT ATH GG	54.9	0.85	-12.43	-9.98
CYS4_R	CCA AGC AGC TTC RGT NGG RGT	59.5	1.71	-7.24	
ENA1_F	GGT GCC CTA TCN ATG ATY CC	55	1.23	-8.69	-7.15
ENA1_R	AG CTT GTC RGA RCA RAT	44.1	3.16	-6.34	
PRC1_F	AAC ATG CTC GAY TGY TGY	47.2	1.21	-6.76	-16.63
PRC1_R	CTT GAA TCK VGC RAC GTC	53.7	2.5	-16.67	
ACE2_F	GG TCG CAT ATT CAR ACM CAT	45	2.73	-5.99	-5.61
ACE2_R	AG ATC GTG CTG TCG WAC AAA	45	-0.21	-6.64	
CUP1_F	GCCAATGTGGTAGCTGCAAA	50	-0.52	-7.05	-6.69
CUP1_R	TCAGACTTGTACCGCAGGG	55	-2.12	-3.61	
ACT_F	GTATCATGGTCGGTATGGG	52.6	-0.36	-5.38	-5.02
ACT_R	GAAAGTGTGGTGCCAG	56.2	1.13	-5.02	

Tabla 24. Descripción de los genes de resistencia a metales pesados reportados en *Saccharomyces Genome Database* (SGD).

GEN	NOMBRE SISTEMÁTICO	CRÓMOSOMA	POSICIÓN	DESCRIPCIÓN	FUNCION MOLECULAR	PROCESO BIOLÓGICO	COMPONENTE CELULAR	PROTEINA
PRC1	YMR297W	XIII	861922 ... 863520	Carboxipeptidasa vacuolar (proteínasa C, CPY); exopeptidasa C-terminal de amplia especificidad implicada en la degradación proteica no específica en la vacuola; implicado, junto con el homólogo funcional Prc1p, en la activación del zimógeno vacuolar, la descomposición del cuerpo autofágico y la síntesis de proteínas dependientes del autofagosoma; papel en la síntesis de fitoquelatinas; se localiza en el lumen de la vacuola; miembro de la familia de la serina carboxipeptidasa; N-glicosilado	Actividad carboxipeptidasa tipo serina.	Macroatofagia Biosíntesis de fitoquelatina. Catabolismo de la proteína en vacuola, activador del zimógeno.	Hongos tipo celular.	Longitud 532 (a.a), peso molecular (kDa) 59.8 punto isoelectrónico 4.32
ATM1	YMR301C	XIII	867555 ... 869627	Membrana interna mitocondrial ATP-binding cassette (ABC) transportador. Exporta precursores mitocondrialmente sintetizados de clusters de hierro-azufre (Fe / S)	Actividad ATPasa, acoplada al movimiento transmembrana de sustancias.	Homeostasis del ion hierro.	Membrana interna mitocondrial. Componente integral de la membrana.	Longitud 690 (a.a), peso molecular (kDa) 7.7 punto isoelectrónico 10,18.
ENA1	YDR040C	IV	535192 ... 538467	Bomba de sodio ATPasa de tipo P; Involucrados en el flujo de Na ⁺ y Li ⁺ para permitir tolerancia a la sal.	Actividad ATPasa transportador de potasio, actividad ATPasa exportador de sodio, mecanismo fosforilativo.	Respuesta celular a la inanición de glucosa, respuesta hiperosmótica transporte de iones potasio. Respuesta al pH. Respuesta al estrés salino. Transporte de	Membrana plasmática. Periferia celular. Vacuola tipo hongo. Componente integral de la membrana.	Longitud 1091 (a.a), peso molecular (kDa) 120.3, punto isoelectrónico 5.24

GEN	NOMBRE SISTEMÁTICO	CROMOSOMA	POSICIÓN	DESCRIPCIÓN	FUNCION MOLECULAR	PROCESO BIOLÓGICO	COMPONENTE CELULAR	PROTEINA
						iones de sodio. Transporte transmembrana.	Membrana plasmática.	
CYS4	YGR155W	VII	798543 ... 800066	Cistathionine beta-sintasa. Cataliza la síntesis de cistationina a partir de serina y homocisteína, iniciador en la biosíntesis de cisteína. Responsable de la generación de sulfuro de hidrógeno; promoviendo el crecimiento celular que requiere actividad catalítica y reduciendo el tamaño crítico de las células independientemente de la actividad catalítica.	Actividad beta-sintasa de cistationina. Unión a ARNm	Biosíntesis de cisteína a partir de serina. Proceso de biosíntesis de cisteína vía cistationina. Proceso de biosíntesis de sulfuro de hidrógeno. Transulfuración. Punto de control de arranque de inicio del ciclo celular mitótico.	Citoplasma. Gránulos de estrés citoplasmáticos. Mitocondria.	Longitud 507(a.a), peso molecular (kDa): 56.01, punto isoelectrico: 6.66.
GPH1	YPR160W	XVI	861306 ... 864014	Glicógeno fosforilasa necesaria para la movilización de glucógeno; no esencial. Regulado por fosforilación mediada por AMP cíclico. La fosforilación por Cdc28p puede regular, coordinadamente, el metabolismo de los carbohidratos y el ciclo celular; Expresión está regulada por la respuesta al estrés elementos y por la vía kinasa HOG-MAP.	Actividad glucógeno fosforilasa	proceso catabólico del glucógeno	Citoplasma	Longitud 902 (a.a), peso molecular (kDa) 10.3, punto isoelectrico 5.31

GEN	NOMBRE SISTEMÁTICO	CROMOSOMA	POSICIÓN	DESCRIPCIÓN	FUNCION MOLECULAR	PROCESO BIOLÓGICO	COMPONENTE CELULAR	PROTEINA
ACE2	YLR131C	XII	404510 ... 406822	Factor de transcripción requerido para la destrucción del tabique después de la citocinesis; la fosforilación por Cbk1p bloquea la salida nuclear durante la transición M / G1, causando la localización de los núcleos de las células hijas, y también aumenta la actividad de Ace2p; la fosforilación por Cdc28p y Pho85p previene la importación nuclear durante las fases del ciclo celular distintas de la citocinesis; regula la polaridad celular y la morfogénesis; ACE2 tiene un parólogo, SWI5, que surgió de la duplicación del genoma completo. Activador de la expresión de CUP1	Unión específica al ADN de la secuencia del promotor proximal.	Regulación negativa de la transcripción por la ARN polimerasa II.	Citosol, núcleo	Longitud 770 (a.a), peso molecular (kDa) 86.6, punto isoeléctrico 8.51.

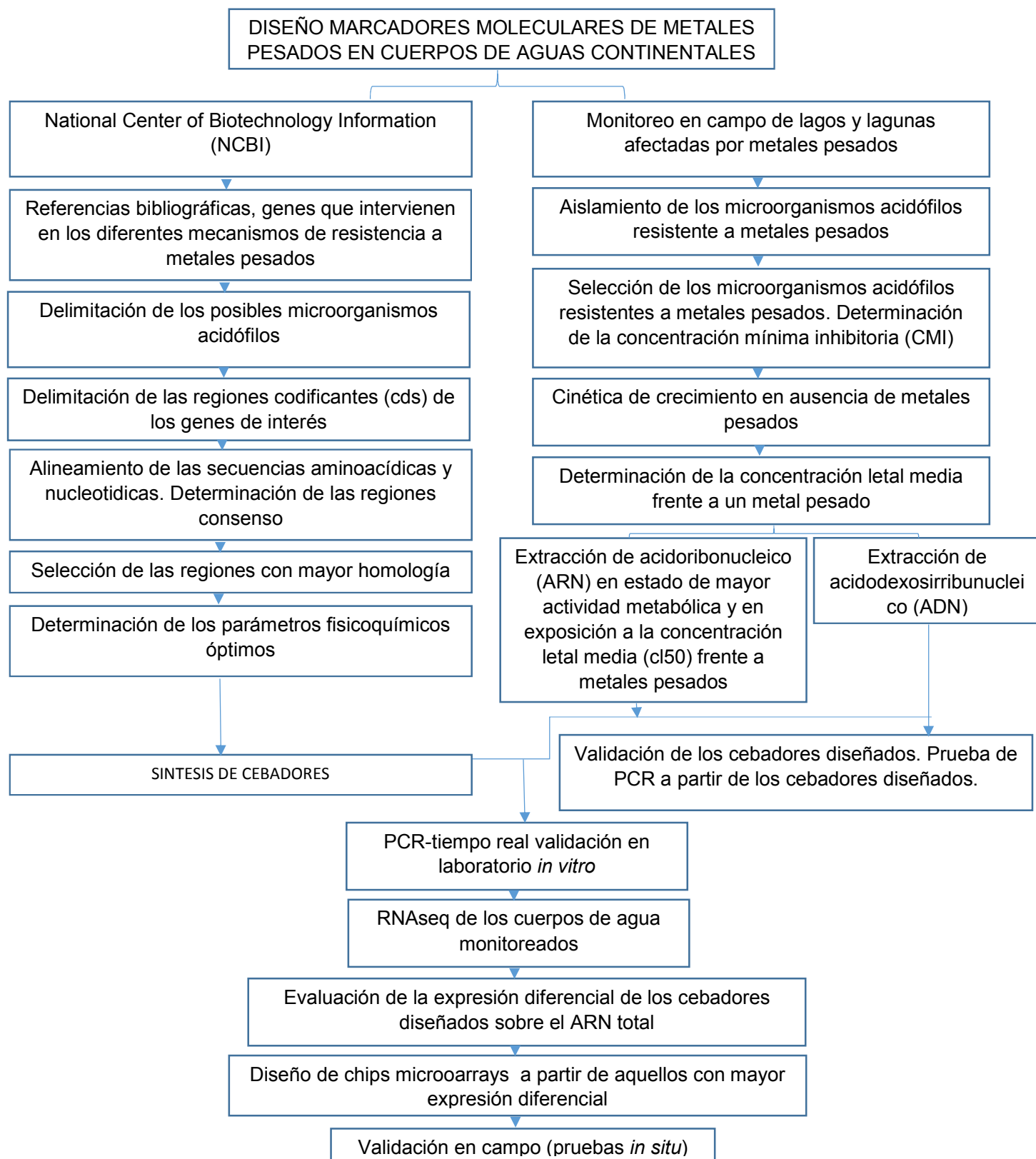


Figura 49. Flujograma de trabajo para el diseño de marcadores moleculares de metales pesados en cuerpos de aguas continentales.